

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



## TESIS DOCTORAL

**Fisiología y fisiopatología del DLK1 en el endotelio vascular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**M<sup>a</sup> Ángeles Higuera López**

Directores

Santiago Lamas Peláez  
Patricia Rodríguez Pérez

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

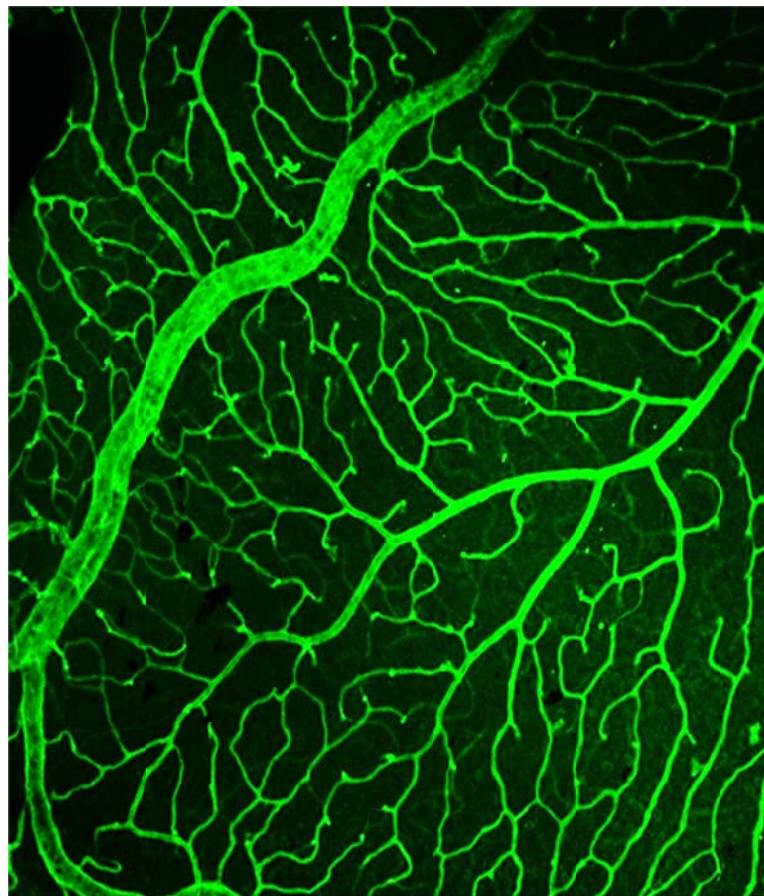
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**TESIS DOCTORAL**



# **FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE DLK1 EN EL ENDOTELIO VASCULAR**



**M<sup>a</sup> Ángeles Higuera López**

**Madrid, 2014**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



# **FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE DLK1 EN EL ENDOTELIO VASCULAR**

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> ÁNGELES HIGUERAS LÓPEZ**

Para optar al grado de Doctor de Bioquímica

Realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO-CSIC)  
bajo la dirección de los Drs. Santiago Lamas Peláez y Patricia Rodríguez Perez

**VºBº de los directores de la tesis**

**VºBº del interesado**

Santiago Lamas  
Peláez

Patricia Rodríguez  
Pérez

M<sup>a</sup> Ángeles Higuera  
López





D. SANTIAGO LAMAS PELÁEZ, Profesor de Investigación del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (España), y DÑA. PATRICIA RODRIGUEZ PEREZ, investigadora del Hospital Mount Sinai, Nueva York (Estados Unidos)

#### CERTIFICAN

Que Dña. M<sup>a</sup> Ángeles Higuera López, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis Doctoral titulado: **“Fisiología y fisiopatología de DLK1 en el endotelio vascular”** y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid.

LOS DIRECTORES,

Fdo. Santiago Lamas Peláez

Fdo. Patricia Rodríguez Pérez



A mis padres, a Ismael y a  
mi hija.

Gracias por estar a mi lado y  
por todo lo que me dais día  
a día. Os quiero.



## **AGRADECIMIENTOS**

Ha llegado el momento de escribir una parte también muy difícil de la tesis, la de dar las gracias a todos los que han contribuido en el desarrollo de este trabajo de alguna u otra forma. Seguramente me dejaré a alguien en el tintero, pido disculpas por ello.

En primer lugar quiero dar las gracias a la persona que me dio la oportunidad, hace ya mucho tiempo, de entrar en el mundo de la investigación en el laboratorio, el Prof. Santiago Lamas, mi director de tesis, muchas gracias por haberme dado un voto de confianza y haberme ayudado a desarrollarme profesionalmente. Comencé en esto rellenando cajas de puntas y preparando diluciones como técnico y finalmente, casi sin saber cómo me encuentro defendiendo una tesis doctoral. Gracias por ser más que un jefe, por tu lado humano con las personas siempre dispuesto a ayudar en lo profesional y también si está en tu mano en lo personal. A la Dra. Patricia Rodríguez, mi co-directora de tesis, contigo he aprendido lo que es trabajar de forma rigurosa en un laboratorio de investigación. Gracias por querer transmitirme el amor y la ilusión en este trabajo, eres un ejemplo a seguir.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, después de tanto tiempo en el laboratorio han pasado muchos compañeros, unos han dejado más huella que otros, pero con todos ellos he compartido muchos momentos inolvidables que quedarán para siempre en mi recuerdo. Nunca podré olvidar a mis compañeros del CNIC y la ilusión con la que comenzábamos nuestra andadura profesional. Sara, Ceci, Tania, Yoli, Conchi, Susana, Inma, Laura, Esther, Cristina Castaños, Cristina de Álvaro, Tarín, fue fantástico conocerlos y trabajar con vosotros. También gracias a Antonio Martínez y María Monsalve, por guiarme en mis primeros experimentos en el laboratorio.

A todos mis compañeros del CIB y CBMSO. Gracias Mariano, mi compañero de laboratorio y de inglés, por compartir esas risas y por tu bondad. A Fernando, por ese café y charla por la mañana para despejarnos un poco y coger fuerzas para comenzar, y como no a tu equipo: los chicos del fibroteam: David, José y Oscar, grandes profesionales con una carrera exponencial. A Estrella, compañera de batallas desde mis comienzos, todavía recuerdo el

primer día que nos conocimos a poco tiempo de nacer tu peque. Gracias por coger las riendas y ser la mamá del laboratorio. A Rosa, con su tesón y trabajo, allá por donde vayas dejarás el listón muy alto. Siempre recordaré nuestro viaje a los “Estates” con nuestras aventuras, gracias por tu compañerismo y tu amistad. Cris, gracias por ese toque divertido que le das a todos los días, haces que todo sea más fácil. Macarena, gracias por estar dispuesta siempre a enseñarme y ayudarme con los animales del laboratorio. A las nuevas generaciones que vienen pisando fuerte, Patricia, Verónica y María, con un futuro muy prometedor. Y al resto de compañeros y amigos que han pasado y están en el laboratorio: Clara, Noemi, Fran, Eva, y Marta. Gracias a todos.

Por supuesto tengo que agradecer a personas de otros laboratorios, sin su colaboración este trabajo no habría sido posible: Arántzazu Alfranca y Juan Miguel Redondo, Álvaro González-Rajal, Jose Luis de la Pompa, Jorge Laborda. Gracias a todos.

Por último quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, Manuel y M<sup>a</sup> Ángeles, gracias por darme todo lo que una hija puede desear. Os quiero. A mis hermanos Manuel y Eduardo, y mis cuñadas Rufi y Arancha. A mis sobrinos Manu, Jaime y Edu, sois unos chavales ejemplares. Gracias por esos fines de semana en familia que ayudan a desconectar del trabajo y sentirte entre los tuyos. Gracias a mi suegra Ana María y mi cuñada Ana por todo vuestro cariño. Gracias a mi marido Ismael, por compartir tu vida conmigo, por estar a mi lado, por ayudarme, por quererme. Te quiero. Gracias a mi hija, M<sup>a</sup> Ángeles, aunque seas muy pequeña y no lo sepas ni entiendas eres el motor de mi vida, haces que todo se vea de forma diferente y mejor. Te quiero.







## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN EN INGLÉS</b>   | <b>19</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>27</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | <b>31</b> |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>   | <b>37</b> |
| <b>1.RESUMEN</b>   | <b>41</b> |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>45</b> |
| 2.1. El proceso de angiogénesis  | 45        |
| 2.2. Rutas implicadas en Angiogénesis: VEGF, Notch y TGF $\beta$ .             | 50        |
| 2.2.1. La ruta de señalización del VEGF  | 51        |
| 2.2.2. La ruta de señalización de Notch  | 53        |
| 2.2.3. La ruta de señalización de TGF- $\beta$                                 | 57        |
| 2.3. Componentes de la ruta de Notch: receptores, ligandos canónicos y dianas. | 59        |
| 2.3.1. Receptores de la ruta de Notch.   | 59        |
| 2.3.2. Ligandos canónicos de la ruta de Notch.                                 | 61        |
| 2.3.3. Dianas de la ruta de Notch.   | 62        |
| 2.4. DLK1: Ligando no canónico de la ruta de Notch.                            | 64        |
| 2.4.1. Estructura de Dlk1.   | 65        |
| 2.5. Papel fisiológico de DLK1.  | 69        |
| 2.6. Papel fisiopatológico de DLK1.  | 72        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | <b>79</b> |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>83</b> |
| 4.1. Materiales  | 83        |
| LINEAS CELULARES   | 83        |
| RATONES  | 84        |
| REACTIVOS USADOS PARA LOS CULTIVOS CELULARES                                   | 84        |
| ADENOVIRUS   | 85        |
| ANTICUERPOS  | 86        |

|  |            |
|--|------------|
| VECTORES PLASMÍDICOS.....  | 87         |
| 4.2 MÉTODOS.....   | 88         |
| ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA DE LAS MUESTRAS E<br>INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....                         | 88         |
| EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA<br>POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....              | 88         |
| ENSAYO DE REENDOTELIZACIÓN EN PLACA (“Scratch Assay”).....   | 90         |
| FORMACIÓN DE ANGIOTUBOS EN MATRIGEL.....   | 90         |
| EXPLANTES DE ANILLOS DE AORTA.....   | 91         |
| ENSAYO DE MATRICES TRIDIMENSIONALES (“PLUGS”) DE MATRIGEL<br>.....   | 91         |
| TRANSFECCIÓN CELULAR Y ENSAYO DE LUCIFERASA.....   | 92         |
| ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....  | 93         |
| APOPTOSIS.....   | 93         |
| AISLAMIENTO Y TINCIÓN DE RETINAS.....  | 94         |
| ENSAYO DE GANANCIA Y PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN PEZ ZEBRA....   | 95         |
| ENSAYO ANGIOGENESIS EN TUMOR XENOINJERTADO.....  | 96         |
| ENSAYO CON REPORTERO DE NOTCH EN PEZ ZEBRA.....  | 97         |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 97         |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>101</b> |
| 5.1 Expresión de Dlk1 en endotelio vascular adulto.....  | 101        |
| 5.2 Regulación de la angiogénesis por Dlk1.....  | 103        |
| 5.2.1. Efecto de la ganancia y pérdida de función de la ruta de Notch sobre<br>la formación de angiotubos..... | 103        |
| 5.2.2. La sobreexpresión de Dlk1 en células endoteliales inhibe la<br>formación de angiotubos in vitro.....    | 104        |
| 5.2.3. La ausencia de DLK1 se correlaciona con un aumento de la<br>angiogénesis.....                           | 106        |

|  |     |
|--|-----|
| 5.2.4. La ausencia de <i>Dlk1</i> se correlaciona con mayor angiogénesis ex vivo. ....   | 108 |
| 5.2.5. La ganancia de función de <i>Dlk1</i> también promueve la angiogénesis in vivo.....                                     | 110 |
| 5.2.6. El proceso de re-endotelización en placa se retrasa significativamente por la sobreexpresión de <i>Dlk1</i> .....       | 112 |
| 5.2.7. El proceso de re-endotelización en placa se acelera en ausencia de <i>Dlk1</i> . ....                                   | 113 |
| 5.2.8. Estudio de la proliferación, viabilidad y apoptosis en células carentes de <i>Dlk1</i> respecto a células control. .... | 114 |
| 5.2.9. La ausencia de <i>Dlk1</i> promueve cambios en la arquitectura vascular de la retina. ....                              | 116 |
| 5.2.10. La ausencia de <i>Dlk1</i> se asocia con dilatación de los vasos y con hemorragias.....                                | 119 |
| 5.2.11. Regulación de la angiogénesis por <i>Dlk1</i> en el modelo de pez zebra. ....  | 121 |
| 5.2.12. Regulación de la angiogénesis tumoral en el pez zebra.....   | 124 |
| 5.3 Interacción de <i>DLK1</i> con la ruta de Notch.....   | 125 |
| 5.3.1. <i>DLK1</i> disminuye la expresión del gen reportador de luciferasa de <i>Hes-1</i> . ....                              | 125 |
| 5.3.2. <i>Dlk1</i> disminuye la expresión del reportador <i>RbpJK</i> in vivo. ....  | 126 |
| 5.3.5. La ruta de Notch está activada en células endoteliales carentes de <i>Dlk1</i> . ....                                   | 128 |
| 5.3.3. El efecto de <i>DLK1</i> tiene lugar antes de la proteólisis del receptor de Notch. ....                                | 129 |
| 5.3.4. La sobreexpresión de <i>NICD</i> bloquea el efecto de <i>Dlk1</i> sobre la angiogénesis en matrigel.....                | 130 |
| 5.4 Interacción de <i>Dlk1</i> con la ruta de TGF- $\beta$ . ....  | 131 |
| 5.4.1 Activación por TGF- $\beta$ en células endoteliales MLEC WT y KO para <i>Dlk1</i> . ....                                 | 131 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.4.2. Papel de TGF- $\beta$ en la regulación de la angiogénesis retiniana de ratones WT y KO para Dlk1. .... | 132        |
| <b>6. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>137</b> |
| 6.1. DLK1 se expresa en células endoteliales de organismos adultos.....                                       | 138        |
| 6.2. La ausencia de DLK1 está asociada con un aumento en la angiogénesis. ....                                | 139        |
| 6.3. DLK1 regula el desarrollo vascular en angiogénesis tumoral en pez zebra. ....                            | 141        |
| 6.4. DLK1 inhibe la angiogénesis por antagonismo con la ruta de Notch. ..                                     | 143        |
| 6.5. DLK1 inhibe la ruta de Notch en un paso inicial de la señalización. ...                                  | 148        |
| 6.6. Dlk1 interfiere con la activación de la ruta de TGF- $\beta$ .....                                       | 150        |
| <b>7. CONCLUSIONES. ....</b>  | <b>155</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>159</b> |
| <b>9. ANEXO I .....</b>   | <b>177</b> |
| <b>10. ANEXO II .....</b>   | <b>206</b> |

***RESUMEN EN INGLÉS***



## **INTRODUCTION**

Blood vessels are essential for the development and viability of vertebrate embryos. Mesoderm cells give rise to endothelial precursor cells through several pathways. Some endothelial cells may derive from hemangioblast, which are able to evolve into both hematopoietic and endothelial cells. During the initiation phase, named vasculogenesis, angioblast aggregate forming-cords and differentiate into endothelial cells. These primitive vessels must branch and establish new connections. This process is called angiogenesis and is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones. This angiogenic expansion phase requires phenotypic heterogeneity among endothelial cells in their response to stimulatory cues. Sprouting angiogenesis entails the selection of individual endothelial cells for outward migration from a parent vessel. This leading tip cells respond to a VEGF gradient by migrating according to it. Endothelial cells behind the tip cell in the emerging sprout, termed stalk cells, do not migrate independently, but instead proliferate and eventually lumenize. Vessel remodeling also contributes to network patterning.

Each phase of vascular development requires the integration of multiple signaling pathways to precisely coordinate cells behavior such that multicellular vessel networks form and expand. In this thesis we focus on the Notch and TGF- $\beta$  pathways. The Notch signaling pathway is essential for vascular development and recent evidence implicates Notch signaling as a critical integration node for the establishment and/or maintenance of endothelial heterogeneity within developing vessels. TGF- $\beta$  signaling has a crucial role at the vascular plexus-remodeling stage.

DLK1 (Delta like-1 homologue), also known as Pref-1 and FA1, is an EGF-like membrane bound protein that contains six tandem EGF-like repeats, a juxtamembrane region with a TACE-mediated cleavage site, a transmembrane domain, and a short intracellular tail. TACE-mediated cleavage yields a soluble form of DLK1 with a molecular weight of 50 KDa. Alternative DLK1 splicing products have been described in several mammalian species resulting in membrane bound and soluble forms. The structure of DLK1, defined as non canonical ligand, is very related to the canonical Notch ligands Delta like-1, 3, 4



(DII1, DII3 and DII4) and Jagged 1 and 2 (Jagg1 and Jagg2). However DLK1 misses the DSL domain (Delta-Serrate-LAG2) which is present at the N-terminus of all canonical Notch ligands and is necessary for the interaction between Notch receptor and the ligands. Despite the absence of a DSL domain, interaction between DLK1 and the Notch receptor was shown in the yeast GAL4 two-hybrid system. DLK1 was described in neuroendocrine tumours and preadipocytes. DLK1 affects several differentiation processes, including adipogenesis, muscular and neuronal differentiation, bone differentiation, and haematopoiesis.

Since the Notch signaling pathway is essential for vascular development and physiology by controlling angiogenesis in pre- and post-natal life, we reasoned that DLK1 could contribute to regulate this process in adult endothelial cells through the interaction with Notch receptors.

### **OBJECTIVES**

–To study the expression of DLK1 in adult endothelial cells of different species (human, mouse, porcine and bovine) using a series of in vitro and in vivo approaches: tube-like structure formation in vitro, aortic ring ex vivo assays, matrigel plug assay in vivo, retinal isolation and studies of vascular development in the zebrafish model.

- To investigate whether the suppression of Dlk1 promotes vessel migration in a model of zebrafish xenograft tumour formation.

– To elucidate the potential interaction of DLK1 with the Notch signaling pathway in the context of angiogenesis, using several approaches: Notch-dependent luciferase reporter Hes-1, protein and mRNA levels of different Notch signaling pathway targets (Hey-1, Slug, Snail).

– To identify the step at which DLK1 is interfering with the Notch signaling pathway.

– To explore whether the TGF- $\beta$  pathway, involved in angiogenesis, is also interacting with DLK1.

### **RESULTS**

We found that DLK1 was expressed in murine, human, porcine and bovine adult endothelial cells. As DLK1 is a non canonical ligand of the Notch pathway which is essential for angiogenesis we explored the potential role of DLK1. First we observed an increased formation of angiotubes in mouse lung endothelial cells (MLEC) derived from Dlk1-null mice both in the absence and presence of VEGF (Fig 21). This phenotype was reversed by the introduction of adenoviral expression constructs bearing DLK1 (Fig 22). In addition, BAEC overexpressing DLK1 showed delayed re-endothelization after 18 h of in-plate endothelial wound-healing (scratch assay) (Fig 27). Consistently, wound closure was significantly accelerated in MLEC from Dlk1-null mice (Fig 28). To address the contribution of proliferation and/or apoptosis to the final effect observed, we evaluated the consequences of DLK1 suppression in MLEC. The absence of DLK1 significantly correlated with increased cell proliferation (Fig 29), in the absence of apoptosis or necrosis (Fig 30). Using an *ex-vivo* model of aortic segments from DLK1 null mice, these exhibited a significantly higher pro-angiogenic profile (Fig 23) that was abrogated by re-expression of DLK1 in a dose-dependent fashion (Fig 24). We then investigated the effect of DLK1 expression in an *in vivo* model of ectopic angiogenesis of Matrigel plugs implanted subcutaneously in the abdominal region of healthy mice. Whereas VEGF-treated plugs showed macroscopic neovessel formation and increased haemoglobin content, functional vascular structures were drastically reduced in plugs exposed to DLK1 expression compared to controls (Fig 25). To confirm the antiangiogenic role of DLK1 *in vivo*, we studied the retinal vessel formation in Dlk1-null mice compared with their wild-type counterparts. Retinas from null mice showed focal hypervascularization at p5 and p14 (Fig 31). A detailed study of the affected regions in the retinas of Dlk1-null mice demonstrated an increased number of filopodia and tip cells (Fig 32) consistent with a dysregulation of angiogenesis. The retinal vascular network from Dlk1 KO mice exhibited enlarged and tortuous veins. It also presented arterioles with larger diameter, disappearance of micro-vascular capillary beds and loss of their characteristic straight morphology. Also hyaluronic vessels from P6 KO retinas appeared to be more tortuous and of larger caliber compared to P6 WT vessels (Fig 33). When observed at a macroscopical level, Dlk1-null mice showed more hemorrhages compared with their wild-type counterparts (Fig 34). Frontal

cryostat sections of isolectin B4 stained embryos at E12.5 of development showed dilated vessels in the Dlk1 KO embryo compared to wild-type (Fig 35). To investigate the role of DLK1 in angiogenesis in other vertebrate models, we performed experiments in embryos from zebrafish. The human version of DLK1 was microinjected and overexpressed in one-cell stage embryo. Three days after the injection, embryos expressing DLK1 showed an abnormal pattern of dorsal vascularization that was dose-dependent and consisted of aberrant intersegmental vessel branching and a lack of an established dorsal longitudinal anastomotic vessel (Fig 36). To study whether DLK1 played a role by itself in the development of zebrafish vasculature, the endogenous orthologous mRNA was targeted with a morpholine (MO). Six day-old larvae showed ectopic subintestinal angiogenesis. This phenotype was dose-dependent on the concentration of the MO and was rescued by the expression of human DLK1 (Fig 37). In a model of zebrafish xenograft tumour formation, suppression of DLK1 resulted in visible migration of vessels towards the tumour cell mass, an effect reversed by co-injection with human DLK1 mRNA (Fig 38).

To study the potential interaction of DLK1 with the Notch signaling pathway in the context of angiogenesis we investigated the expression of the Notch-dependent luciferase reporter Hes-1. We observed that the expression of DLK1 reduced Hes-1 activity in a dose-dependent manner (Fig 39). To confirm that DLK1 was also inhibiting Notch signaling in another model, we performed studies in zebrafish embryos expressing the Notch-dependent fluorescent effector RbpJk. DAPT drastically reduced fluorescence associated with Notch signaling, while antagonism of Dlk1 with a MO moderately enhanced it. In contrast, injection of embryos with the human Dlk1 mRNA promoted a marked abrogation of Notch-dependent fluorescence (Fig 40). We then studied the abundance of Notch signaling pathway-related proteins in MLEC from Dlk1-null mice compared to WT. In Dlk1-null mice the levels of Notch 1 intracellular domain (NICD-Notch active) were higher than in WT. We also found increased levels of target proteins of the Notch pathway (Slug, Snail and Hey-1) in MLEC from Dlk1-null mice compared to WT. When we performed studies of angiotube formation in porcine aortic endothelial cells (PAEC) overexpressing NICD, we

observed that the angiotube formation was not reduced by DLK1 overexpression (Fig 44).

To explore if DLK1 interacted with the TGF- $\beta$  pathway we studied the expression of the luciferase reporter PAI-1, a target of the TGF- $\beta$  pathway. The luciferase activity was higher in MLEC from Dlk1-null mice compared to WT in response to TGF- $\beta$  (Fig 45). To investigate if these results had a reflection in vivo, we studied retinas from DLK1 KO mice exposed to TGF- $\beta$ . We confirmed that the levels of another TGF- $\beta$  target, Id\_1, were higher compared to WT (Fig 46).

## **CONCLUSIONS**

This work shows for the first time to our knowledge that:

1. DLK1 is expressed in murine, human, porcine and bovine adult endothelial cells showing a dual inhibitory effect on migration and proliferation.
2. It acts as a powerful antiangiogenic factor in several models and organisms. The absence of DLK1 correlates with focal retinal hyperangiogenesis and an increased number of filopodia and tip cells.
3. DLK1 regulates vascular development and tumour angiogenesis in zebrafish.
4. It negatively regulates Notch signaling, likely by interfering with canonical ligand-receptor interaction.
5. DLK1 may also affect other pathways such as TGF- $\beta$ . The response to TGF- $\beta$  is higher when the levels of DLK1 are downregulated.

Antagonism of the Notch pathway by the use of decoys has proven to be effective in animal models of tumour progression and the use of endogenous inhibitor of the Notch pathway has been claimed to represent a potential therapeutic avenue. As an inhibitor of the Notch pathway. DLK1 may represent a candidate on which to focus for the development of new therapies with antiangiogenic effects.







## **ABREVIATURAS**

**AML:** Leucemia mieloide aguda.

**ANG-1:** Angiopoietina-1

**ANK:** Repeticiones de anquirina.

**BAEC:** Células endoteliales de aorta bovina.

**BMPs:** Proteínas morfogenéticas óseas.

**C/EBP:** Proteínas de unión al activador CCAAT.

**CE:** Célula endotelial.

**Dlk1:** Homólogo Delta like 1

**Dll1, 3 y 4:** Delta-like 1, 3 y 4.

**Dfp:** Dias post-fecundación.

**DSL:** Delta/Serrate/Lag-2.

**EE:** Endosomas tempranos.

**ER:** Retículo endoplasmático.

**FA1:** Antígeno fetal 1.

**GDFs:** Factores de diferenciación y crecimiento.

**GH:** Hormona de crecimiento.

**HCC:** Carcinoma hepatocelular.

**HpF:** Horas post-fecundación.

**hMSC:** Células mesenquimales humanas.

**HUVEC:** Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

**iPS:** Células madre pluripotentes inducidas.



**MEC:** Matriz extracelular.

**MIF:** Factor inhibitorio Mulleriano.

**MLEC:** Células endoteliales de pulmón murino.

**MVBs:** Cuerpos multivesiculares.

**MO:** Morfolino.

**NECD:** Dominio extracelular de Notch.

**NICD:** Dominio intracelular de Notch.

**NP 1 y 2:** Neurofilina 1 y 2.

**O-Fut 1:** o-Fucosiltransferasa.

**PAEC:** Células endoteliales de aorta porcina.

**PDGF-B:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PEST:** Motivo rico en prolina/ácido glutámico/serina/treonina)

**PIGF ó PGF:** Factor de crecimiento de placenta.

**PPAR $\gamma$ :** Receptor de peroxisoma-proliferador activado gamma.

**Pref-1:** Factor preadipocitario.

**RAM:** Módulo de asociación de RBP Jk.

**SHH:** Sonic hedgehog.

**TAD:** Dominio de activación transcripcional.

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

**T $\beta$ R I, II y III:** Receptores de TGF- $\beta$  tipo I, II y III.

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular.

**VRAP:** Proteína asociada a VEGF.

**ZOG:** Factor específico zona del glomérulo de la glándula adrenal.





## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Desarrollo de vasculogénesis y angiogénesis.....   | 45  |
| <b>Figura 2.</b> Brote angiogénico.....   | 47  |
| <b>Figura 3.</b> Crecimiento de vasos sanguíneos por invaginación.....  | 48  |
| <b>Figura 4.</b> Reclutamiento e incorporación de células de la circulación<br>sanguínea.....                                 | 48  |
| <b>Figura 5.</b> Desarrollo de los vasos sanguíneos.....  | 50  |
| <b>Figura 6.</b> Ruta de señalización de VEGF en células endoteliales en<br>angiogénesis.. ..                                 | 52  |
| <b>Figura 7.</b> Ruta de señalización de Notch.....   | 54  |
| <b>Figura 8.</b> Especialización célula tip/stalk durante el brote angiogénico. ....  | 56  |
| <b>Figura 9.</b> Ruta de señalización TGF-B/BMP en células endoteliales en<br>angiogénesis.. ..                               | 58  |
| <b>Figura 10.</b> Receptores Notch.....   | 60  |
| <b>Figura 11.</b> Ligandos canónicos de receptores Notch.....   | 61  |
| <b>Figura 12.</b> Diversidad de dianas de Notch.....  | 64  |
| <b>Figura 13.</b> Estructura de Dlk1.....   | 66  |
| <b>Figura 14.</b> Representación esquemática del cluster Dlk1-Dio3.. ..   | 67  |
| <b>Figura 15.</b> Diferenciación de células madre mesenquimales (MCS) en varios<br>tipos celulares. ....                      | 69  |
| <b>Figura 16.</b> Expresión de Dlk1 en células endoteliales de organismos adultos<br>provenientes de diferentes especies.. .. | 101 |
| <b>Figura 17.</b> Expresión de mRNA en células endoteliales de diferentes<br>organismos adultos.. ..                          | 102 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 18.</b> Formación de angiotubos en matrigel de células endoteliales porcinas.....   | 103 |
| <b>Figura 19.</b> Formación de angiotubos de células endoteliales de aorta porcina (PAEC) sembradas sobre matrigel.....   | 104 |
| <b>Figura 20.</b> Niveles de P-VEGFR2 por western blot en células endoteliales de aorta bovina.....   | 105 |
| <b>Figura 21.</b> Formación de angiotubos en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) a partir de animales control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 sembradas sobre matrigel..... | 106 |
| <b>Figura 22.</b> Formación de angiotubos inhibida por Dlk1 en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) knockout para Dlk1 sembradas sobre matrigel.                            | 107 |
| <b>Figura 23.</b> Explantes de anillos de aorta de ratones control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 embebidos en matrigel..   | 108 |
| <b>Figura 24.</b> Explantes de aorta de animales knockout (KO) para Dlk1.   | 109 |
| <b>Figura 25.</b> Ensayo de angiogénesis in vivo mediante plugs de matrigel..   | 110 |
| <b>Figura 26.</b> Estudio histológico de la secciones de los plugs de matrigel implantados subcutáneamente (Hematoxilina-Eosina).   | 111 |
| <b>Figura 27.</b> Efecto de la sobreexpresión de Dlk1 en ensayo de migración sobre células endoteliales.....  | 113 |
| <b>Figura 28.</b> Efecto de la ausencia de Dlk1 en ensayo de migración sobre células endoteliales. ....   | 114 |
| <b>Figura 29.</b> Viabilidad y proliferación en células WT respecto a células KO para Dlk1. ....  | 115 |
| <b>Figura 30.</b> Apoptosis en células WT y KO para Dlk1.....   | 116 |
| <b>Figura 31.</b> Angiogénesis retiniana en animales control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 a 5 y 14 días del periodo postnatal..   | 117 |
| <b>Figura 32.</b> Células tip y filopodios en el frente angiogénico de la retina.....   | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 33.</b> Red vascular de la retina en ratones WT y KO para Dlk1.....  | 119 |
| <b>Figura 34.</b> Hemorragias en retinas de animales KO para Dlk1 comparadas con animales control (WT). .....                                  | 120 |
| <b>Figura 35.</b> Secciones frontales de embriones a estadio 12.5 (E 12.5) teñidas con isolectina B4. ....                                     | 121 |
| <b>Figura 36.</b> Fenotipo de ganancia de función en pez zebra dosis dependiente de Dlk1.....  | 122 |
| <b>Figura 37.</b> Embriones WT de pez zebra. ....  | 123 |
| <b>Figura 40.</b> Imágenes de microscopia de fluorescencia de larvas.. ....  | 124 |
| <b>Figura 41.</b> Efecto de Dlk1 sobre la actividad del promotor de Hes-1.....   | 125 |
| <b>Figura 42.</b> Pez zebra que expresa el elemento de respuesta a Notch (Tg(ptf1a:eGFP)jh1) a los 2 días postfecundación. ....                | 127 |
| <b>Figura 43.</b> Niveles de proteínas implicadas en la ruta de Notch en células MLEC WT y KO para Dlk1.....                                   | 128 |
| <b>Figura 44.</b> Regulación de Snail y Slug en células MLEC WT y KO para Dlk1.. .....   | 129 |
| <b>Figura 45.</b> Efecto de Dlk1 sobre la actividad del promotor de Hes-1 en células endoteliales que sobreexpresan NICD.....                  | 130 |
| <b>Figura 46.</b> Formación de angiotubos de células endoteliales de aorta porcina (PAEC) que sobreexpresan NICD sembradas sobre matrigel..... | 131 |
| <b>Figura 47.</b> Activación de la ruta de TGF-B en células WT y KO para Dlk1....  | 132 |
| <b>Figura 48.</b> Imágenes representativas de retinas de ratones WT y KO para Dlk1. ....   | 133 |
| <b>Figura 49.</b> Fenotipo de las retinas de ratones KO para Dlk1.....   | 146 |
| <b>Figura 50.</b> Co-cultivo de células OP estromales y células BAEC.. ....  | 147 |
| <b>Figura 51.</b> Modelo de inhibición de la ruta de Notch por DLK1.....   | 149 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 52.</b> Actividad de la ruta de Notch por Hes-1 con modificación post-traducciona | 150 |
|---|-----|







## **LISTA DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Anticuerpos .....          | 86 |
| <b>Tabla 2.</b> Vectores plasmídicos ..... | 87 |
| <b>Tabla 3.</b> Secuencias de primers..... | 89 |







## 1.RESUMEN

El objetivo de esta tesis es el estudio del papel de la proteína DLK1 (el homólogo de Delta Like 1) en el desarrollo de la vasculatura, en concreto de la angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes. Este proceso ocurre en situaciones fisiológicas, tales como el desarrollo embrionario, formación de la placenta, en la vascularización del endometrio durante el ciclo menstrual, crecimiento óseo y cicatrización de heridas y en procesos patológicos, donde se da un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos, tales como la psoriasis, la degeneración macular asociada a la edad, el desarrollo de tumores, las úlceras diabéticas y la artritis reumatoide inmunogénica.

La proteína DLK1 está implicada en la diferenciación de distintos tipos celulares: adipocitos, osteoblastos, hepatocitos, células musculares y hematopoyéticas. Tiene una estructura muy similar a los ligandos canónicos de la ruta de Notch y se le clasifica como un ligando no canónico de dicha ruta, la cual está implicada en diferentes procesos, siendo uno de los más importantes el de angiogénesis.

En este trabajo se describe la expresión de DLK1 en células endoteliales procedentes de organismos adultos de diferentes especies (bovina, murina, porcina y humana). Hasta el momento únicamente se había descrito su expresión en varios tejidos a nivel embrionario como son la glándula pituitaria, páncreas, pulmón, glándula adrenal, placenta y tejidos derivados del mesodermo, mientras que en adultos su expresión era conocida en glándula pituitaria, renal y determinados tipos de tumores.

Debido a su expresión en el endotelio y a su implicación en la ruta de Notch se estudió si podría desempeñar algún papel en el proceso de angiogénesis. Para ello hicimos varias aproximaciones utilizando modelos in vitro (scratch-assay y formación de angiotubos en matrigel), ex vivo (ensayos de anillos de aorta), e in vivo (ensayo de implantación de estructuras de matrigel “plugs” subcutáneamente, estudio de la formación de la vasculatura en

la retina de ratones y estudio de la formación de la vasculatura en el modelo de pez zebra).

La sobreexpresión de DLK1 fue capaz de inhibir de forma notable la formación de angiotubos, mientras que la carencia de DLK1 produjo un aumento de la formación de angiotubos en células endoteliales procedentes de animales knockout (KO) para *Dlk1*. En los experimentos in vivo se observó como DLK1 es capaz de inhibir la formación de nuevos vasos, mientras que una carencia de DLK1 da lugar a alteraciones en la estructura de los vasos. En el modelo del pez zebra la sobreexpresión de DLK1 dió lugar a una formación aberrante de los vasos, mientras que una disminución de la expresión se asoció con un aumento de angiogénesis ectópica así como un aumento en la angiogénesis tumoral.

El mecanismo a través cual DLK1 podría ejercer su acción en el proceso de angiogénesis podría estar mediado por varias rutas. Una de ellas es la ruta de Notch, ya que alteraciones en la expresión de DLK1 conlleva a inhibición o activación de dicha ruta. Así en las células endoteliales procedentes de animales carentes para *Dlk1* hay una activación medida por las dianas finales de dicha ruta. Además DLK1 también podría estar ejerciendo su efecto a través de otros mecanismos, como por ejemplo la ruta de TGF- $\beta$ , ya que se observó como en las células KO para *Dlk1* hay una mayor respuesta a TGF- $\beta$ .

Por los resultados obtenidos en este trabajo puede concluirse que la proteína DLK1 está implicada en la regulación del proceso de angiogénesis, no solamente a nivel fisiológico, sino también a nivel patológico. Estos resultados ponen de manifiesto una ruta de regulación del proceso de angiogénesis.



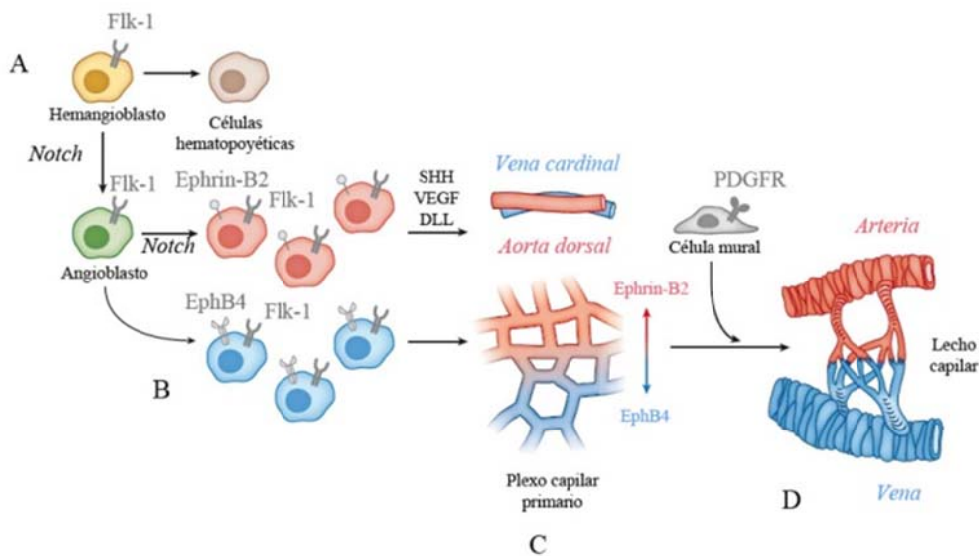




## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El proceso de angiogénesis

La formación de la vasculatura en el embrión se inicia por la aparición de unos agregados de células progenitoras denominadas hemangioblastos en el saco vitelino. Los hemangioblastos pueden diferenciarse a células hematopoyéticas o a células endoteliales. La primera fase de la formación de vasos sanguíneos se denomina vasculogénesis e implica la formación de vasos de novo. Suele distinguirse de la angiogénesis, que implica la formación de vasos sanguíneos a partir de otros ya preexistentes. La interconexión de estos vasos primitivos da lugar a la formación de un plexo vascular primario que sufre un proceso de remodelación (**Fig. 1**).



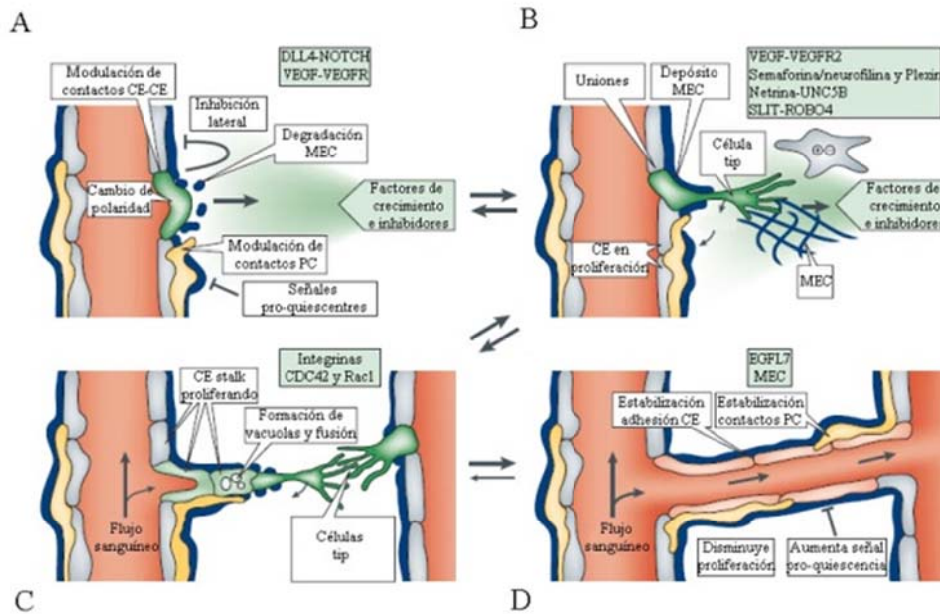
**Figura 1. Desarrollo de vasculogénesis y angiogénesis.** En el embrión el precursor hemangioblasto puede dar lugar a las células de la línea hematopoyética y a angioblastos con importante participación de la ruta de Notch (A). La ruta de Notch también contribuye a la diferenciación en arteria o vena (B). Los angioblastos intraembrionarios se agregan en la aorta dorsal o en la vena cardinal; este proceso está mediado por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), por la familia de proteínas Sonic hedgehog (SHH) y la ruta de Notch. En el saco vitelino, los angioblastos se fusionan para formar el plexo vascular (C). Después del remodelado vascular, se reclutan células murales para que los nuevos vasos se establezcan y maduren. Este proceso está mediado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), y la angiopoietina-1 (ANG-1) (D).

Durante el proceso de angiogénesis las células endoteliales migran y proliferan en respuesta a varios estímulos, ensamblándose en túbulos que contienen uniones célula-célula características del endotelio.

Este proceso puede ocurrir mediante cuatro mecanismos diferentes [1, 2]:

- a) Formación de nuevos "brotes" angiogénicos (mecanismo conocido como "sprouting"), que se divide en varios pasos: a) la activación de la célula endotelial, b) degradación local de la membrana basal vascular y la matriz extracelular, c) proliferación de las células endoteliales y d) migración para formar el nuevo brote. Después se produce la formación del lumen y finalmente la estabilización del vaso nuevamente formado mediante el reclutamiento de los pericitos y células del músculo liso (**Fig. 2**).

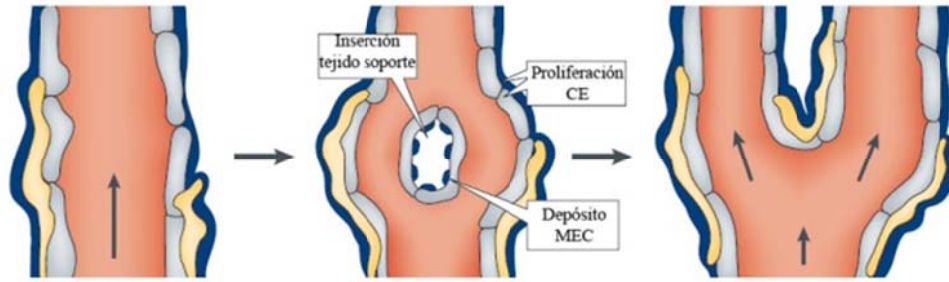
Se ha visto que el conjunto de células endoteliales implicadas en este proceso es bastante heterogéneo y responden de forma diferente frente a estímulos angiogénicos. La célula que se encuentra en el frente (denominada "tip") no prolifera en respuesta a factores de crecimiento [3], sino que responde a la señalización por gradientes de VEGF emitiendo filopodios. Contiguas a estas células se encuentran las células denominadas "stalk", que quedan extendidas, con pocos filopodios pero estableciendo un lumen y proliferando para dar soporte a la célula que migra al frente [4] [5].



**Figura 2. Brote angiogénico** El brote está controlado por el balance entre señales pro-angiogénicas (VEGF) y factores pro-quiescentes (contacto con pericitos, ciertas moléculas de MEC o inhibidores de VEGF). En condiciones favorables para la angiogénesis algunas células endoteliales pueden emerger (célula en verde), mientras que otras células no responden (células en gris). El brote requiere el cambio de polaridad apical-basal, la inducción de movilidad y actividad invasiva, la modulación de los contactos célula-célula y la degradación de la matriz extracelular (A). El crecimiento de la célula endotelial migratoria está guiado por gradientes de VEGF. La liberación de PDGFB por esta célula promueve el reclutamiento de pericitos al nuevo brote. Las uniones CE-CE se deben mantener tras la formación del lumen para evitar fugas (B). Pueden surgir interacciones de adhesión o repulsión cuando se encuentren dos células migratorias. La formación del lumen en las células que forman el “tallo” implica la fusión de vacuolas (C). Los procesos de fusión en la interfaz CE-CE establecen un lumen continuo. El flujo sanguíneo mejora la liberación de oxígeno y así reduce las señales pro-angiogénicas que son inducidas por hipoxia. Esta perfusión también promueve el proceso de maduración, como la estabilización de las uniones celulares, deposición de matriz y unión de pericitos. La retirada de los factores de crecimiento puede desencadenar la retracción del brote (D).

Figura adaptada de Ralf H. Adams y Kari Alitalo, 2007 (Ref. 2.)

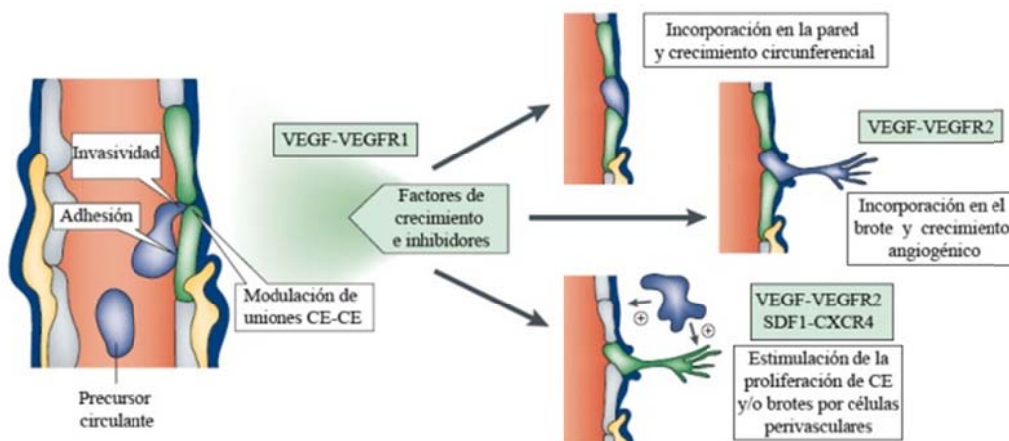
- b) Generación de invaginaciones que se producen en vasos preexistentes. Este mecanismo se demostró inicialmente en la circulación pulmonar de rata y tiene cuatro fases principales: creación de un área de contacto entre paredes endoteliales opuestas, reorganización de las uniones endoteliales, formación de un centro intersticial de pared endotelial y remodelado de los nuevos vasos divididos en dos capilares independientes (**Fig. 3**).



**Figura 3. Crecimiento de vasos sanguíneos por invaginación.** Este proceso implica proliferación, movimiento celular, degradación de matriz extracelular y depósito de nuevas moléculas de matriz extracelular.

Figura adaptada de Ralf H. Adams y Kari Alitalo, 2007 (Ref. 2)

- c) Incorporación de células precursoras endoteliales circulantes a la pared del vaso sanguíneo: este reclutamiento de células endoteliales puede contribuir a la angiogénesis que tiene lugar a través de los otros mecanismos [5] (**Fig. 4**).



**Figura 4. Reclutamiento e incorporación de células de la circulación sanguínea.** Requiere señales quimiotácticas positivas y factores locales que promueven la adhesión a las células endoteliales. La migración transendotelial y/o la incorporación de células precursoras en el endotelio requiere la modulación de los contactos CE-CE. Las células precursoras circulantes (angioblastos) pueden diferenciarse en células endoteliales y permitir la expansión del diámetro del vaso o pueden ser recluidos para nuevos brotes angiogénicos. Las células que provienen de la circulación no tienen que adquirir necesariamente un fenotipo endotelial, sino que pueden promover la proliferación y el brote de células endoteliales locales perivasculares.

Figura adaptada de Ralf H. Adams y Kari Alitalo, 2007 (Ref. 2)



- d) Proceso de elongación y ensanchamiento: ocurre como reestructuración de vasos preexistentes en respuesta a la demanda metabólica de células adyacentes. Este proceso también se ha descrito como remodelado y da lugar finalmente a la estructura ramificada en los vasos sanguíneos.

Para que esta red vascular sea funcional requiere la separación de una red venosa y otra arterial que están interconectadas mediante un lecho de capilares que se establece entre los órganos distales. Mientras los tubos endoteliales que forman el plexo vascular primitivo son indistinguibles morfológicamente [6], las venas y arterias maduras son diferentes en la composición de la matriz extracelular, espesor y abundancia de músculo liso y de otras células de soporte que aportan propiedades mecánicas y fisiológicas especializadas.

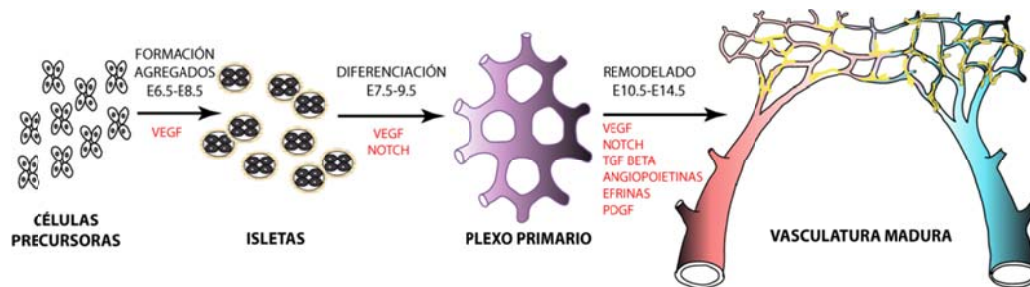
Varios estudios in vivo han demostrado una expresión diferencial en células endoteliales de arteria o vena de EphrinB2 y EphB4 respectivamente, en embriones de ratón antes de establecerse la circulación, lo que indica que la diferenciación en arteria o vena puede estar predeterminada genéticamente [7-9]. La inactivación genética de EphrinB2 o EphB4 interrumpe el remodelado angiogénico de arterias y venas y, como consecuencia de ello el animal muere a mitad de la gestación por anomalías vasculares [7]. Se ha descrito como la activación selectiva de la ruta de Notch por DLL4 induce la expresión de EphrinB2 en células endoteliales [10].

Además existe una red vascular linfática que está formada también por células endoteliales y se encuentra interconectada a la red arteria-vena mediante el conducto torácico. Ambas redes endoteliales son esenciales para la homeostasis en el organismo y su malformación o disfunción contribuye al desarrollo de enfermedades [11, 12].

El proceso de angiogénesis es también un fenómeno fisiológico en el organismo adulto, que se da en los órganos reproductivos femeninos durante la foliculogénesis en el ovario y formación del cuerpo lúteo, así como en el endometrio durante el ciclo menstrual y en el desarrollo embrionario. También

está implicada en el crecimiento óseo y la cicatrización de heridas. Sin embargo también es un proceso fundamental en estados patológicos donde se da un crecimiento anormal de estos vasos sanguíneos, como la tumorigénesis, donde el tumor necesita la formación de nuevos vasos para poder crecer y promover la metástasis. Además está implicada en enfermedades de la piel como la psoriasis, enfermedades neovasculares intraoculares, úlcera diabética, artritis reumatoide inmunogénica y enfermedad cardiovascular.

Varias rutas han sido implicadas en el proceso de angiogénesis: VEGF-VEGFRc; Notch-DSL (Delta-Serrate-LAG2); Angiopoietina- Tie2; EphrinB2-EphB4; TGF $\beta$  y PDGF [5] (**Fig 5**).



**Figura 5. Desarrollo de los vasos sanguíneos.** Inicialmente las células mesenquimales no diferenciadas reciben señales de VEGF para llegar a convertirse en células endoteliales o hematopoyéticas partiendo de pequeños grupos de células (isletas de células sanguíneas). Estos grupos de células se unen para formar un plexo primario. Después tiene lugar una fase de remodelado, con fusión, regresión y expansión para formar nuevos vasos. Finalmente se obtiene un plexo vascular maduro.

## 2.2. Rutas implicadas en Angiogénesis: VEGF, Notch y TGF $\beta$ .

Por razones de relevancia en relación con los resultados presentados en esta memoria se detallan a continuación las rutas de VEGF, Notch y TGF $\beta$ .

### 2.2.1. La ruta de señalización del VEGF.

El VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), fue identificado inicialmente por su capacidad para mediar permeabilidad vascular y después se describió como agente mitogénico para células endoteliales [13, 14]. Hoy en día se sabe que es una citoquina esencial para el desarrollo y la homeostasis del sistema vascular. La haploinsuficiencia de VEGF da lugar a muerte embrionaria a mitad de la gestación debido a defectos cardiovasculares [15, 16]. Asimismo, la sobreexpresión de VEGF da lugar a alteraciones en el desarrollo vascular cardíaco y produce la muerte en el embrión [17], de modo que los niveles de VEGF deben estar estrechamente controlados.

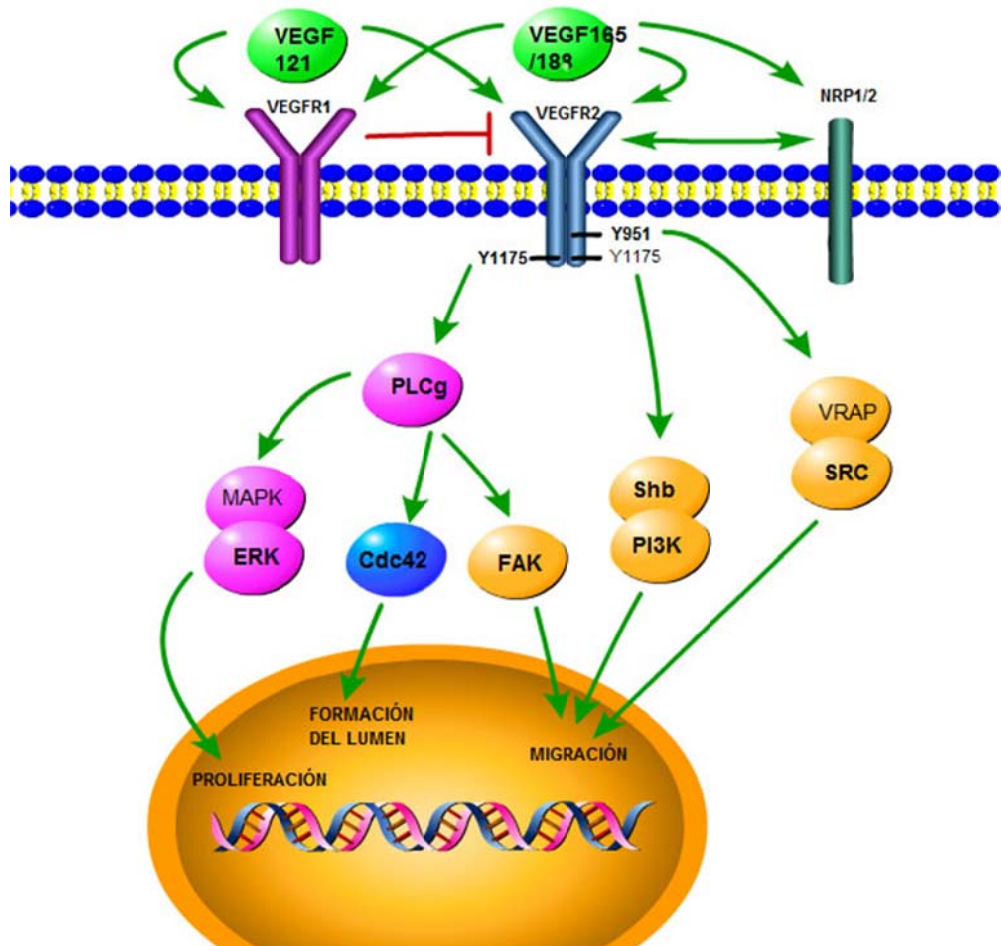
El VEGF-A es un miembro prototípico de una familia génica que incluye: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de placenta (PIGF o PGF). Estas moléculas interactúan con tres receptores tirosina quinasa, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1) y VEGFR3 (Flt4), y otros dos receptores no tirosina quinasa, neuropilina 1 y 2 (NP1 y NP2), que se unen además a otros ligandos. Por splicing alternativo pueden generarse cuatro isoformas diferentes de VEGF-A: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>. El VEGF<sub>165</sub> es una proteína homodimérica que se une a heparina con afinidad media [18]. Los VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> son capaces de unirse con mayor afinidad a la heparina, y casi siempre se encuentran unidos a proteoglicano heparansulfato en la superficie celular o en la matriz extracelular. El VEGF<sub>121</sub> no puede unirse a heparina y es una proteína que difunde libremente.

Los estudios en modelos genéticos deficientes empleando modelos de ratón deficientes en la isoforma VEGF-A, han confirmado la importancia del gradiente de VEGF-A en el desarrollo del sistema vascular, regulado por el balance entre el VEGF que difunde libremente y el VEGF unido a proteoglicano heparansulfato.

El VEGFR2 media la mitogénesis y permeabilidad vascular en las células endoteliales en respuesta a VEGF-A. En cambio el VEGFR1, dependiendo de su localización [19], puede regular negativamente la señalización del receptor 2 secuestrando VEGF [20, 21], y promoviendo además la migración de monocitos [22] y la secreción de proteasas y de otros



factores de crecimiento por células endoteliales [23, 24]. Se ha descrito también el crecimiento de determinadas células tumorales asociado a la sobreexpresión de este receptor [25, 26].



**Figura 6. Ruta de señalización de VEGF en células endoteliales en angiogénesis.** Los VEGFR1 (Flt1) y VEGFR2 (Flk1/KDR) representan los dos receptores de VEGF principales en las células endoteliales en angiogénesis. El VEGF121 se une a VEGFR1 y VEGFR2, mientras que VEGF165 y VEGF188 también pueden unirse al co-receptor de la neuropilina-1 (NP1). El VEGF promueve migración, proliferación, morfogénesis y expresión génica en células endoteliales.

Figura adaptada de Matthew T. Holderfield and Christopher C.W. Hughes, 2008 (Ref. 31)

Los factores PIGF y VEGF-B se unen selectivamente a VEGFR1 [21, 27], mientras que VEGF-C y D se unen principalmente a VEGFR3, mediando la linfangiogénesis [28]. Las isoformas de VEGF-A que se unen a heparina también pueden interactuar con los correceptores NP1 y NP2, que potencian la señalización a través de VEGFR2 de forma independiente [29, 30]. En la vía de señalización VEGF-A se une al receptor VEGFR2, y la presencia de NP1 o NP2 aumenta la señal en respuesta a VEGF<sub>165</sub>, pero no a VEGF<sub>121</sub>. Esta unión implica la fosforilación en los residuos de Tyr1175 del receptor, la unión de PLC $\gamma$ , y la activación de la cascada MAPK/ERK con el subsiguiente aumento de la proliferación celular [31](**Fig. 6**).

En contraste, la migración está mediada por dos cascadas de señalización a partir del receptor. La primera incluye el adaptador Shb y su unión a la Tyr1175 fosforilada para activar la cascada PI3K. La segunda se relaciona con una proteína asociada a VEGF (VRAP), que se une a la Tyr 951 fosforilada, activándose la cascada Src.

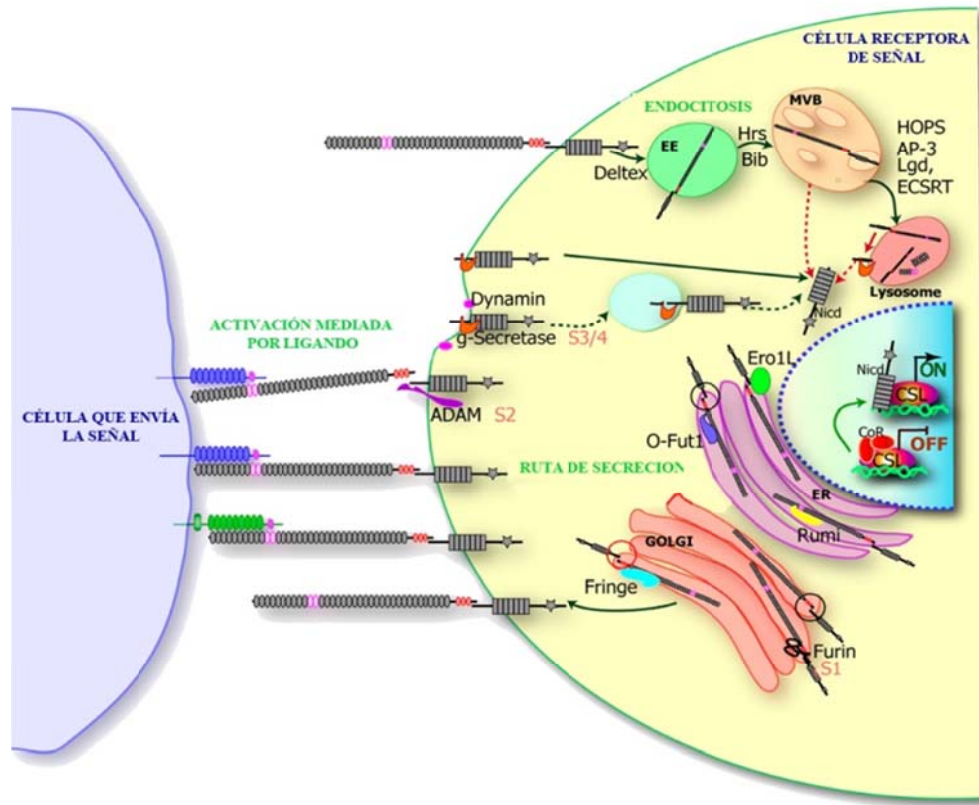
Finalmente el VEGFR2 también interactúa con FAK, lo cual es esencial para la renovación de las adhesiones focales (**Fig. 6**)

### 2.2.2. La ruta de señalización de Notch.

La ruta de señalización de Notch es un sistema de comunicación entre células. Dicha ruta es esencial en los mecanismos de regulación de genes que están implicados en múltiples procesos de diferenciación, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta [32-34]. En mamíferos, la ruta de Notch está compuesta por 4 receptores (Notch 1-4) y 5 ligandos: Jagged1, Jagged2, Delta-like (Dl)1, Dll3 y Dll4, a los que en conjunto se les denomina familia DSL (Delta/Serrate/Lag-2) [35].

Normalmente el receptor de Notch se procesa en Golgi mediante una furina y se expresa en la superficie celular como heterodímero unido de forma no covalente [36]. La interacción del ligando con el receptor da lugar a una serie de cortes proteolíticos secuenciales del receptor. El primer corte en la membrana está mediado por unas enzimas que pertenecen a la familia ADAM

(A Disintegrin And Metalloproteinase): ADAM10 (kuzbanian) en drosophila y ADAM17 (TACE) en mamíferos.



**Figura 7. Ruta de señalización de Notch.** La traducción de Notch se produce en el retículo endoplasmático (ER), donde es glicosilado por una O-fucosiltransferasa (O-Fut1) y una O-glucosiltransferasa (Rumi). Notch se traslada a Golgi donde se procesa por una Furin proteasa en el sitio S1 y además se modifica por la N-acetilglucosaminiltransferasa Fringe (1). En la activación mediada por ligando; Notch interacciona con los ligandos DSL, lo que da lugar a una serie de cortes proteolíticos (S2-ADAM y S3/4-γ-secretasa). Esta secretasa también puede procesar dentro del compartimento endocítico (2). Notch además puede sufrir una regulación por endocitosis, dándose el transporte de Notch en endosomas tempranos (EE), cuerpos multivesiculares (MVBs), endosomas tardíos y lisosomas.

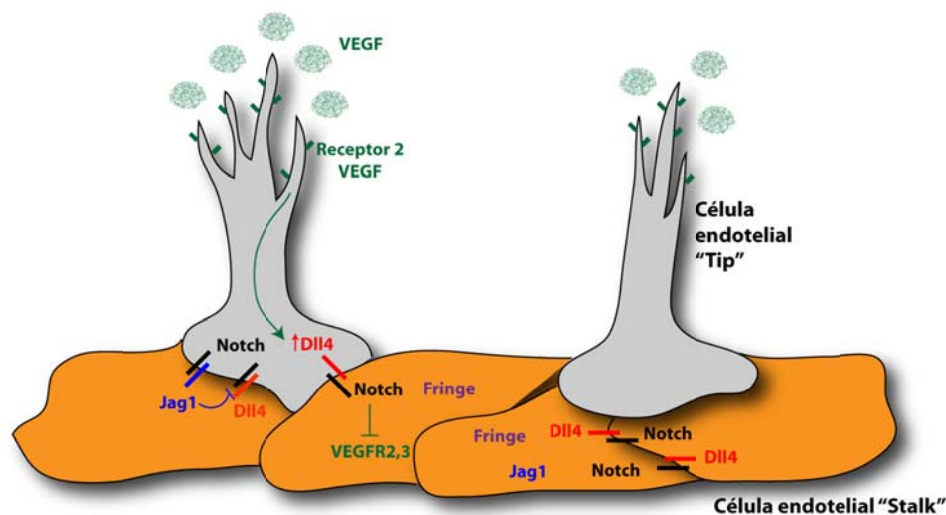
Figura adaptada de An-Chi Tien et al, 2009 (Ref. 42)

Después se producen 2 cortes por el complejo  $\gamma$ -secretasa (presenilina1, presenilina2, Aph-1 y Nicastrina) generando el dominio intracelular de Notch (NICD), que es la forma activa del receptor [37-39], el cual se trasloca al núcleo para iniciar la transcripción génica. Una vez en él, NICD interacciona con el represor transcripcional CSL (CBF-1, Supresor of Hairless, Lag-1), también conocido como RBP-Jk (Recombination Signal-Binding Protein 1 for Jk) y CBF1 (C promoter-Binding Factor 1) y el coactivador Mastermind [40] lo que da lugar a la desrepresión/activación de los genes diana Notch-CSL. Además hay otros factores de transcripción (ej. CBP/P300 y PCAF) que se reclutan hacia este complejo para promover el aumento en la expresión de los genes diana de Notch [41, 42] (**Fig. 7**).

La  $\gamma$ -secretasa también procesa el ligando (DII1) que libera su dominio intercelular y es capaz de interactuar con Smad-2, Smad-3 y Smad-4 aumentando la transcripción de la ruta TGF- $\beta$  dependiente de Smad [43]. Además Notch también está implicado en una ruta de señalización independiente de CSL [44].

La ruta de Notch es crucial para la formación del brote angiogénico. La activación de esta ruta se ve modificada por la respuesta heterogénea a VEGF de las células endoteliales implicadas en el proceso de angiogénesis, de manera que en aquellas células que responden activamente a VEGF, denominada célula emergente o “tip” se produce un aumento en la expresión del ligando DII4 [45], en esta célula “tip” los niveles de la ruta de Notch no son muy altos ya que hay un antagonismo por Jagged1 de DII4. Esto hace que se produzca un incremento en la expresión de VEGFR2 y una disminución en VEGFR1, lo que aumenta la sensibilidad de esta célula emergente a VEGF [46]. En general eso promueve que esta población celular adquiera un fenotipo migratorio y “emerja” para migrar desde el vaso parental. Los receptores de Notch en las células vecinas (“stalk”) se unen a los ligandos DII4 y activan la ruta de Notch e inhiben la expresión de VEGFR2 y el proceso de gemación en estas células. Las células stalk sobreexpresan Jagged1, que antagoniza la actividad DII4. Ello limita la señalización de Notch en las células emergentes que mantienen su respuesta a la estimulación por VEGF y migran para establecer el nuevo vaso. La actividad de Jagged1 depende de Fringe. En mamíferos existen 3 proteínas Fringe: lunatic fringe, manic fringe y radical

fringe. Estas proteínas son N-Acetilglucosaminiltransferasas que modifican el receptor de Notch mediante la adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en regiones específicas de las repeticiones EGF donde previamente se ha unido un residuo de fucosa. Tras la unión de la N-acetilglucosamina se añaden inmediatamente un residuo de galactosa y otro de ácido siálico, de manera que finalmente se incorporan 4 residuos de azúcar. En presencia de este tetrasacárido la interacción del receptor de Notch con el ligando Delta da lugar a una activación de la ruta, mientras que la interacción del receptor modificado con el ligando Jagged da lugar a una inhibición (**Fig. 8**).



**Figura 8. Especialización célula tip/stalk durante el brote angiogénico.** Las rutas de señalización de VEGF y Notch están implicadas en la especialización de las células hacia tip o stalk en el endotelio vascular.

Figura adaptada de Rui Benedito et al, 2009 (Ref. 173)



### 2.2.3. La ruta de señalización de TGF- $\beta$ .

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una citoquina multifuncional que regula varias funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración, adhesión, apoptosis y supervivencia de diferentes tipos celulares [47]. Experimentos de ganancia y pérdida de función en ratones han demostrado que el factor TGF- $\beta$  es importante durante el proceso de embriogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis durante la vida adulta [48]. En el sistema cardiovascular la ruta de TGF- $\beta$  está implicada en procesos de arteriogénesis, angiogénesis, en el desarrollo cardíaco y patologías cardiovasculares [49, 50], en el remodelado de la matriz extracelular y en el desarrollo de la fibrosis [51]. Además las acciones del TGF- $\beta$  son altamente dependientes del contexto celular.

La familia de TGF- $\beta$  incluye más de 40 miembros, que tienen en común una estructura dimérica y la presencia de un motivo estructural de cisteínas. Esta familia está dividida en varias subfamilias: TGF- $\beta$ s, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de diferenciación y crecimiento (GDFs), factor inhibitorio Mulleriano (MIF) y activinas o inhibinas.

En mamíferos están presentes tres isoformas de TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Se secretan en forma latente por lo que necesitan ser activadas por proteasas o trombospondina antes de unirse a su receptor específico. Estos receptores son proteínas serina/treonina quinasa unidas a superficie de tipo I y II (T $\beta$ R-I y T $\beta$ R-II), que forman complejos heteroméricos en presencia de los ligandos dimerizados. Además los ligandos también pueden unirse a co-receptores de endoglina y betaglicano, conocidos como receptores tipo III (T $\beta$ R-III) [52-54].

El ligando soluble se une al receptor tipo II que está constitutivamente activo, después se produce la interacción y fosforilación del receptor tipo I, lo que da lugar a un complejo ligando-receptor activado. Posteriormente el receptor I fosforila las proteínas efectoras que se encuentran por debajo en la cascada de señalización: las Smads.

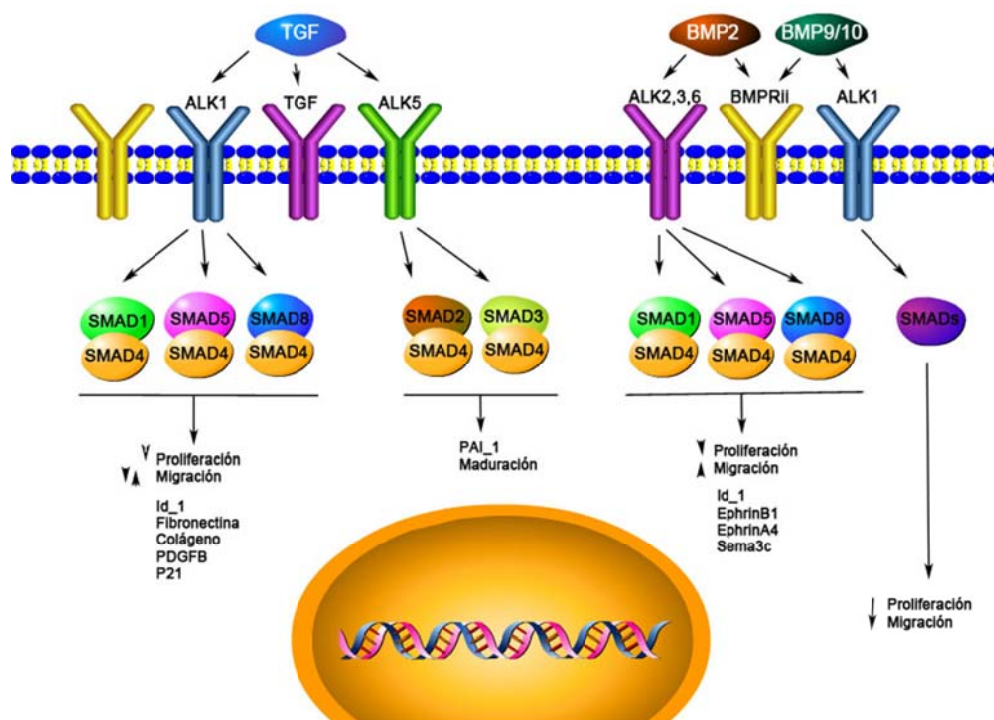
La familia de las Smads se encuentra muy conservada y se divide en tres grupos:

- a) R-Smads: Son Smads asociadas a receptor.

- b) Co-Smads: Son Smads cooperadoras.
- c) I-Smads: Son Smads inhibitorias.

Se han descrito cinco Smads asociadas a receptor en humanos, que son sustrato para los diferentes receptores. Smad2 y Smad3 son sustrato para receptores activados por TGF- $\beta$  y activinas; mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 median rutas de señalización activadas por BMPs, GDFs y MIFs.

Una vez fosforilada esta R-Smad se une a la Co-Smad (Smad4), y este complejo se dirige al núcleo donde en colaboración con otros factores de transcripción, se une y regula promotores de diferentes genes diana [54]. Dos de estos genes diana son Smad6 y Smad7, cuya expresión da lugar a una regulación negativa de la ruta de señalización del TGF- $\beta$  [57] [4] (**Fig. 9**).



**Figura 9. Ruta de señalización TGF- $\beta$ /BMP en células endoteliales en angiogénesis.** TGF- $\beta$  señala a través de TGF $\beta$ R-II y Alk1 en células endoteliales activando las Smads. TGF- $\beta$  normalmente suprime la proliferación y podría suprimir o incrementar la migración dependiendo de la presencia de otros factores, como el VEGF. Algunas BMPs (BMP2 y BMP4) son proangiogénicas, incrementando la migración de células endoteliales, en cambio otras (BMP9 y BMP10) suprimen la proliferación y migración.

Figura adaptada de Matthew T. Holderfield and Christopher C.W. Hughes, 2008 (Ref.31)

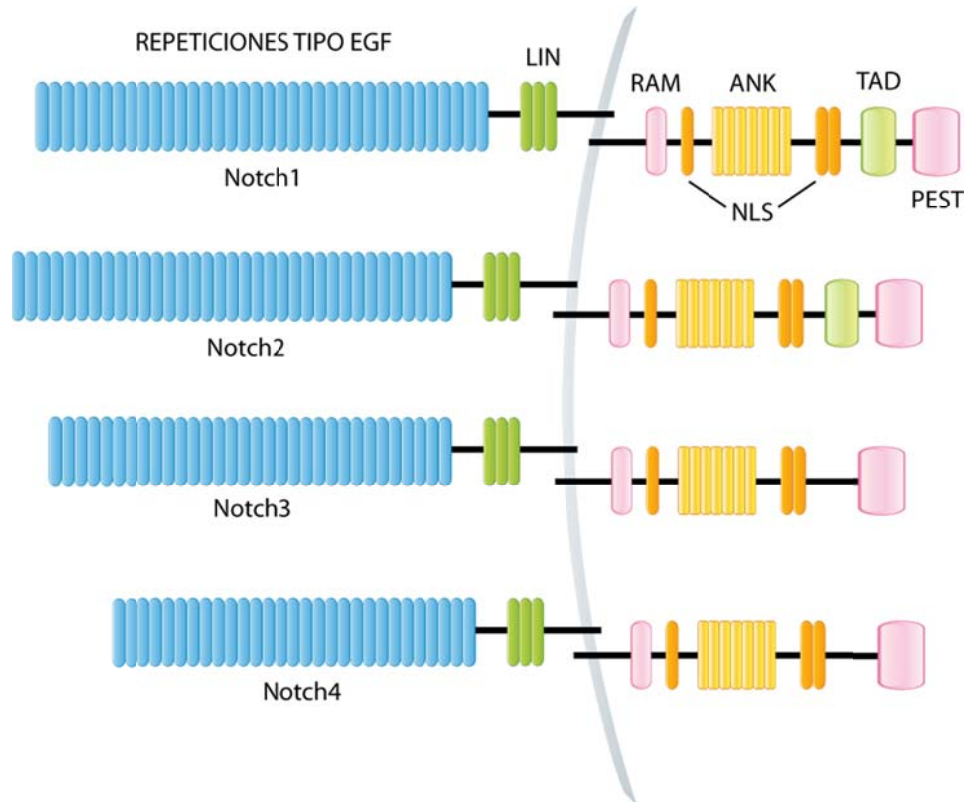
Se ha descrito que la ruta de TGF- $\beta$  coopera con la ruta de Notch en el proceso de angiogénesis. El bloqueo de ALK1 durante el desarrollo postnatal en ratón da lugar a una hipervascularización en la retina. El bloqueo conjunto de ALK1 y la ruta de Notch genera una hipervascularización exacerbada, mientras que la activación de ALK1 es capaz de rescatar el fenotipo de hipervascularización producido por la inhibición de la ruta de Notch [55]. Además se ha descrito que la señalización por BMP mediada por Smad1/Smad5 coopera con la ruta de Notch en la selección de las células tip y stalk. La inactivación específica de endotelio de las proteínas Smad1/Smad5 en embriones de ratón da lugar a una señalización de Notch alterada, lo que produce un aumento del número de células tip [56]. También se ha descrito la cooperación de las rutas de Notch y TGF- $\beta$  en modelos in vitro, donde NICD y Smad3 cooperan en la activación de promotores sintéticos específicos de Notch y Smad, como el promotor fusionado a luciferasa CAGA Luc [57].

### 2.3. Componentes de la ruta de Notch: receptores, ligandos canónicos y dianas.

#### 2.3.1. Receptores de la ruta de Notch.

Existen cuatro receptores de la familia Notch en mamíferos (Notch 1-4). Son proteínas transmembrana tipo I que se sintetizan como precursores de cadena única y que son sometidos a glicosilación por la o-fucosiltransferasa (POFUT1) en el retículo endoplasmático y posteriormente procesados por una furina en el trans-Golgi dando lugar a las dos subunidades extracelular (NECD) e intracelular (NICD) que se encuentran unidas de forma no covalente [32, 38, 58, 59] (**Fig. 10**).





**Figura10. Receptores Notch.** Se han identificado cuatro receptores Notch. Son proteínas transmembrana heterodiméricas que en el dominio extracelular contienen repeticiones tipo EGF y repeticiones LIN/Notch. El dominio intracelular contiene un dominio RAM (módulo de asociación RBPJk), secuencias de localización nuclear, siete repeticiones de anquirina (ANK), y una secuencia PEST (motivo rico en prolina/ácido glutámico/serina/treonina). Notch 1 y Notch2, de forma similar a Notch en *Drosophila*, contienen un dominio de activación transcripcional (TAD).

El dominio extracelular (NECD) contiene:

- Un dominio de 29-36 repeticiones EGF (dependiendo del receptor Notch en concreto), que pueden unir calcio [60] y sufrir modificaciones secundarias de glicosilación y fucosilación [61]. Algunas de estas repeticiones son esenciales para que se produzca la unión con el ligando.
- Un dominio de heterodimerización [62].
- Tres repeticiones Notch/LIN-12 (LNR), que limitan una señalización independiente de ligando.

Además presentan un dominio transmembrana, implicado en transmitir la señal al núcleo.

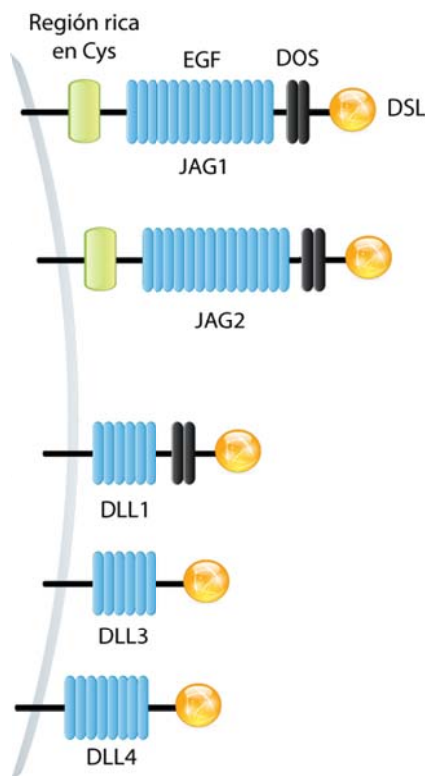
El dominio intracelular (NICD) contiene:

- a) Seis repeticiones de anquirina en tándem, que son necesarias para la transmisión de las señales.
- b) Un dominio rico en glutamina.
- c) Una secuencia C-terminal PEST, que facilita la degradación proteolítica de la proteína.

Los receptores Notch 1 y 4 se expresan en el endotelio vascular, mientras que Notch 3 se expresa en las células musculares lisas y en los pericitos. El receptor Notch 2 se expresa en cardiomiocitos.

### 2.3.2. Ligandos canónicos de la ruta de Notch.

Los ligandos canónicos que unen y activan los receptores Notch son proteínas transmembrana de tipo I. La mayoría de estos ligandos pertenecen a una familia de ligandos, que se caracteriza por la presencia de un dominio DSL (Delta, Serrate y Lag2) [63, 64]. Los ligandos DSL en mamíferos se clasifican en Delta-like (Dl1, Dl3 y Dl4) o Serrate Jagged-like (Jagged1 y Jagged2). Estos ligandos están compuestos por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una región intracelular (**Fig. 11**).



**Figura 11. Ligandos canónicos de receptores Notch.** En mamíferos tienen dos subfamilias, Jagged y Delta-like, donde se han identificado dos y tres miembros respectivamente. Son proteínas transmembrana que contienen una región extracelular con un dominio DSL (Delta/Serrate/LAG-2), dominios DOS (Delta y como OSM-11), repeticiones tipo EGF y una región rica en cisteína. Difieren en el número de repeticiones EGF y en la composición de los dominios.

El dominio extracelular (ECD) contiene:

- a) Un dominio N-terminal, que puede subdividirse en dos regiones diferentes según el contenido en cisteínas: la región N1 rica en cisteínas y la región N2 libre de cisteínas.
- b) Un dominio DSL.
- c) Unos dominios de tipo EGF (factor de crecimiento epidérmico) en tandem (6-16), que están compuestos por unos 40 aminoácidos, entre ellos 6 cisteínas que son capaces de formar puentes disulfuro.

El dominio DSL junto con el extremo N-terminal y las dos primeras repeticiones EGF son necesarios para que estos ligandos se unan a los receptores Notch.

Además presenta un dominio transmembrana, que une las dos regiones extracelular e intracelular.

La región intracelular (ICD) de estos ligandos presenta un dominio C-terminal citoplasmático muy corto detrás del dominio transmembrana. Estas secuencias no están muy conservadas pero contienen múltiples lisinas en las que se podría añadir un residuo de ubiquitina para regular el tráfico intracelular de proteínas. Además muchos ligandos presentan en su dominio C-terminal dominios putativos PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) [65] que son necesarios para que se den interacciones con el citoesqueleto.

### 2.3.3. Dianas de la ruta de Notch.

Tras la activación de Notch, la formación del complejo ternario que contiene CSL, NICD y Mam es esencial para regular la transcripción de los genes diana de esta vía [32, 66].

Los genes diana de Notch-CSL mejor definidos son la familia de factores de transcripción bHLH (basic Helix Loop Helix), HES (Hairy Enhancer of Split) y Hey (Hairy/Enhancer of Split-related with YRPW motif). Estos fueron los primeros en los que se observó un cambio en la transcripción después de la activación de la ruta de Notch [67]. Todas las proteínas HES/HEY parecen funcionar como represores transcripcionales. Presentan un motivo común WRPW/Y en el extremo C-terminal, que es suficiente para reclutar corepresores transcripcionales de la familia Groucho [68, 69].

Además se han encontrado genes implicados en proliferación y apoptosis que están también regulados directamente por Notch. Myc es un gen diana en varios tipos de células cancerosas y en células de *Drosophila* [70-73]. Otros genes diana directamente implicados en promover la proliferación son ciclina D [74-76], string/CDC25 [71, 72] y CDK5 [72]. En otros contextos Notch puede activar inhibidores del ciclo celular como p21[77]. Reaper y Wrinkled/hid en *Drosophila* son genes efectores de apoptosis directamente controlados por Notch [71], al igual que ocurre con bcl2 en mamíferos [78].

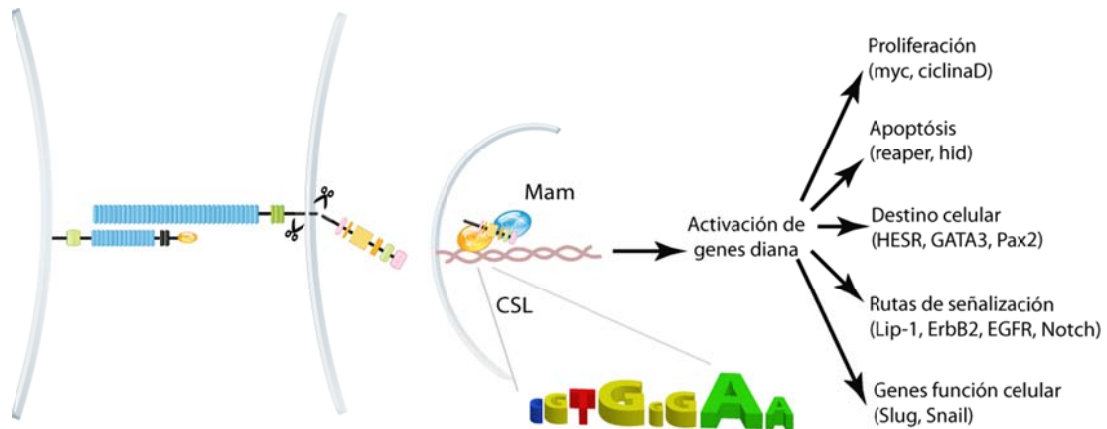
También existen componentes de la ruta de Notch que son dianas en sí mismos de esta vía; Deltex1 es una ubiquitin ligasa que regula el tráfico de Notch y es además una diana transcripcional [79], NRARP es un inhibidor de Notch que parece ser diana de la ruta en un amplio rango de tipos celulares en vertebrados [80, 81] y otros descritos como dianas en invertebrados son neuralized, numb y kuzbanian/Adam10 [82]. Además se ha descrito que Notch1 autoregula su transcripción durante el desarrollo de los timocitos [73, 83].

También se han identificado como dianas componentes de otras rutas de señalización. Entre ellos se encuentran múltiples reguladores de la ruta de Ras identificados mediante bioinformática y screening genético en *C.Elegans*, donde una fosfatasa MAP quinasa, LIP-1 es una diana directa con otros cinco reguladores negativos de la ruta RAS-MAPK [84, 85] [86](Fig. 12).

También se ha descrito que las proteínas Notch regulan la expresión de genes que están implicados en funciones celulares. Entre ellos destaca la familia de proteínas SNAIL constituida por los factores de transcripción Snail y Slug, reguladores clave implicados en la transición epitelio mesénquima [12] que se produce durante la formación de las válvulas cardíacas [87]. Slug es un represor transcripcional cuya expresión está inducida cuando la ruta de Notch se activa por unión del receptor de Notch con el ligando Jagged1. La expresión de Slug es necesaria para la represión del promotor de la VE-Cadherina y de la E-Cadherina, implicados en promover la migración de las células endoteliales transformadas, fenómeno clave en el desarrollo del corazón [88, 89].

Además otros autores han descrito una implicación directa de la ruta de Notch vía Snail en el desarrollo de la transición epitelio mesénquima que sufren

las células epiteliales del túbulo proximal para contribuir al desarrollo de la fibrosis intersticial en la enfermedad renal progresiva [89].



**Figura 12. Diversidad de dianas de Notch.** Diagrama simplificado de la ruta de Notch. La interacción entre el ligando y el receptor permite el corte por la metaloproteasa ADAM y el complejo de la gamma secretasa para liberar el Notch activo [90]. En el núcleo, NICD se une a CSL y recluta Mam para activar los genes diana. Las flechas indican diferentes salidas, con algunos de los genes diana. Se indica la secuencia consenso de unión a CSL. El tamaño indica la frecuencia con la que una base ocupa una posición determinada.

Figura adaptada de Sarah Bray y Fred Bernard, 2010 (Ref. 86)

### 2.4. DLK1: Ligando no canónico de la ruta de Notch.

DLK1 (el homólogo de delta like 1) fue inicialmente identificado en 1993 en carcinomas de pulmón [91], y como el factor preadipocitario 1 (Pref-1), que actúa como regulador negativo de la diferenciación adipocitaria [92]. Un año más tarde en 1994 se aisló el antígeno fetal 1 (FA 1) [93] del fluido amniótico humano durante el segundo trimestre. Además se le denominó con otros nombres: pG2 (a partir de un clon de cDNA que se encontraba aumentado en feocromocitoma) [94] y ZOG (Factor específico de la zona del glomérulo de la glándula adrenal) que es el homólogo de Dlk1 en rata. Todos estos genes codifican para la misma proteína.

La expresión de DLK1 se detecta a día 11 del periodo embrionario en ratón con un incremento progresivo de sus niveles hasta el final de la gestación [92, 95]. A los 12.5 días del estado embrionario la expresión de Dlk1 es elevada en glándula pituitaria, páncreas, pulmón, glándula adrenal, placenta y muchos tejidos derivados del mesodermo (músculo esquelético y cartílago) [96, 97]. A los 16.5 días del estado embrionario los niveles de Dlk1 disminuyen en la mayoría de estos tejidos aunque permanecen en la glándula pituitaria, adrenal y músculo esquelético.

En embriones humanos la expresión es similar al ratón, y la expresión en adulto se restringe a determinados tipos celulares, como células  $\beta$  del páncreas, células somatotropas de la glándula pituitaria, médula ósea, glándula adrenal y músculo esquelético [93, 95, 98-100] .

### 2.4.1. Estructura de Dlk1.

El gen que codifica para DLK1 contiene 5 exones y 4 intrones. El inicio de la transcripción se encuentra a 169 pb por encima del codón de iniciación. En el gen de Dlk1 se produce splicing alternativo que puede alterar la estructura y función de la proteína resultante. En cada forma alternativa de este gen, la región yuxtamembrana extracelular es deletada total o parcialmente, lo que da lugar a reorganizaciones en las repeticiones tipo EGF localizándolas más próximas a la membrana [101]

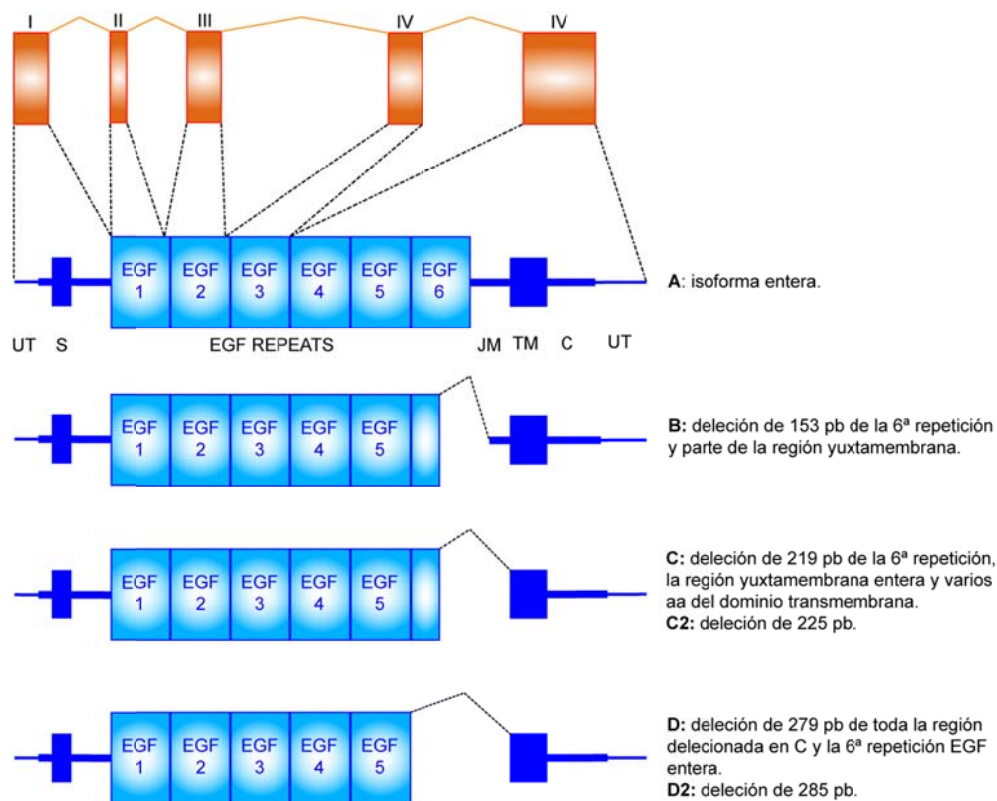
DLK1 se sintetiza como una proteína de 385 aminoácidos con una secuencia señal en el extremo N-terminal y un único dominio membrana de 300-322 aminoácidos. Pertenece a la familia de proteínas de tipo EGF y presenta en su dominio extracelular 6 repeticiones en tándem de tipo EGF, que contienen 6 cisteínas conservadas para la formación de 3 enlaces disulfuro, así como otros aminoácidos característicos de las proteínas que presentan estos dominios de repetición tipo EGF.

Esta proteína se procesa proteolíticamente en un sitio yuxtamembrana y próximo al extremo N-terminal para generar las formas solubles, una mayor de 50 kDa y una más pequeña de 25 kDa respectivamente. Este procesamiento de la proteína se da por una proteasa de la familia ADAM, la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, ADAM<sub>17</sub>).



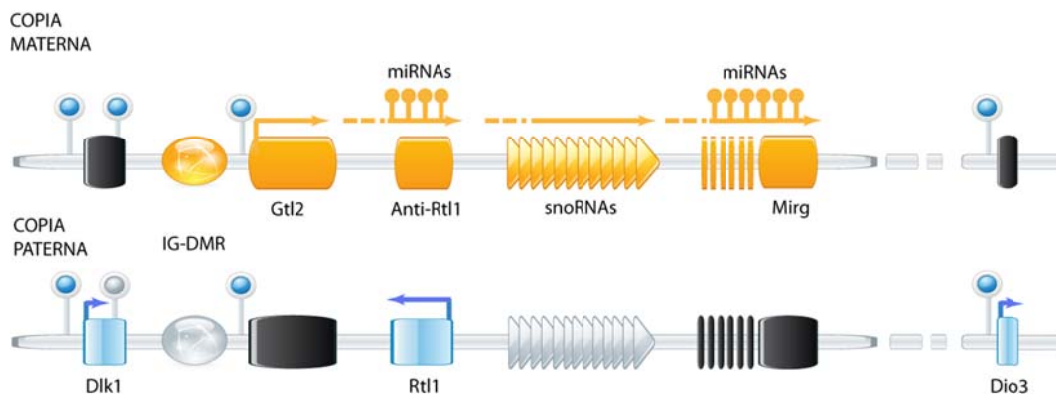
Debido al splicing alternativo que se da a nivel de gen se produce una reorganización de las repeticiones tipo EGF localizándolas más próximas a la membrana [102]. Por ello es posible encontrar varias isoformas de la proteína. Las formas A y B dan lugar a la isoforma mayor soluble de 50 kDa.

Las formas C, C2, D y D2 afectan todas al 6º dominio de la repeticiones EGF. En las formas D y D2 la 6ª repetición de EGF-like se pierde entera. En las formas C, C2, D y D2 se suprime un sitio potencial de N-glicosilación (**Fig. 13**).



**Figura 13. Estructura de Dlk1.** La estructura del gen está compuesta por cinco exones (I-V) y 4 intrones. Hay varias isoformas de la proteína que se originan por splicing alternativo. La proteína se organiza en las siguientes regiones: UT, región no traducida; S, secuencia señal; EGF REPEATS, repeticiones de tipo EGF; JM, región yuxtamembrana; C, dominio citoplasmático.

Dlk1 se encuentra en un cluster de genes regulado por impronta genómica paterna que se encuentra localizado en la zona distal del cromosoma 12 de ratón (12F1), y en el cromosoma 14 humano (14q32). El dominio donde se encuentra Dlk1 contiene 3 genes que codifican para proteínas: Dlk1, Peg11 (Rtl1) y Dio3 que se expresan desde la copia del cromosoma heredado por vía paterna (**Fig. 14**)



**Figura 14. Representación esquemática del cluster Dlk1-Dio3.** Este dominio contiene tres genes que codifican para proteína; Dlk1, Rtl1 y Dio3, expresados desde el cromosoma heredado por vía paterna y múltiples genes no codificantes RNA (ncRNA) expresados desde el cromosoma heredado por vía materna. Esta impronta está regulada por el elemento intergénico DMR (IR-DMR), que se encuentra entre Dlk1 y Gtl2, lo que hace que los genes codificantes sean reprimidos en el cromosoma materno y los ncRNAs sean activos.

Peg11 (Rtl1) es un gen tipo retrotransposon que ha perdido su capacidad para retrotransponerse de forma autónoma y muestra homología con la familia de retrotransposones Ty3/gypsy. Se expresa en estados embrionarios, principalmente en placenta. Dio3 codifica para la yodo-tironina deionidasa tipo 3 (D3), una enzima conservada que contiene selenocisteína y degrada hormona tiroidea (T3) en metabolitos inactivos. Esta hormona tiroidea es muy importante para la funcionalidad del tejido adiposo marrón (BAT) y termogénesis [103, 104], ya que es capaz de estimular la diferenciación del adipocito marrón [105].



Además 7 genes ARNs no codificantes se expresan desde la copia del cromosoma heredada materna: Meg3/Gtl2, Anti-Peg11, Meg8, Irm/"Rian", AK050713, AK053394 y Meg9/Mirg [106]. La mayoría de estos genes no codificantes contienen microRNAs (miRNAs) y/o RNAs nucleares pequeños (snoRNAs) dentro de sus intrones.

Se ha demostrado que la organización y la impronta de este dominio está altamente conservado en humano, ratón y cordero [107, 108].

Este dominio además es muy importante en la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS), ya que la generación de estas células normalmente da lugar al silenciamiento epigenético del cluster. Se encuentra activado en células totalmente pluripotentes y reprimido en células parcialmente pluripotentes. Así, el grado de activación de esta región está directamente relacionado con el nivel de pluripotencia de las células madre [109, 110]. Por ello, la modulación de la impronta genómica en las células madre aporta un nuevo nivel de regulación epigenética para establecer y mantener estas células.

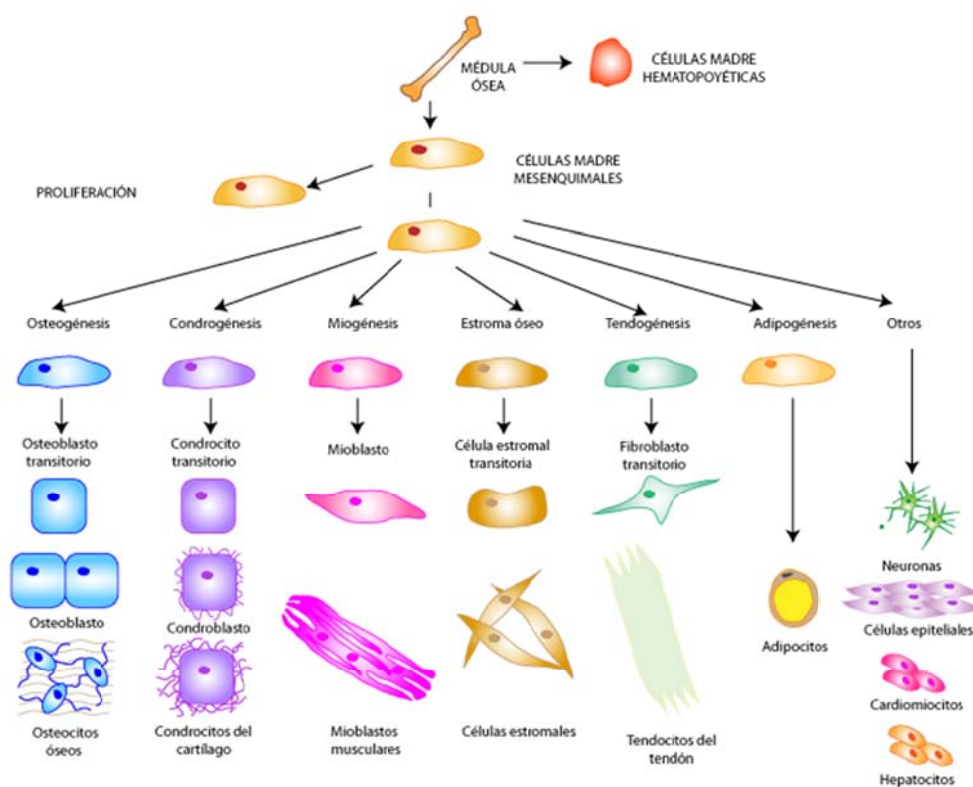
La proteína DLK1 fue una de las primeras proteínas descritas como ligando no canónico de la ruta de Notch, debido a la homología estructural que tiene con la familia de proteínas Notch/Delta/Serrate. Sin embargo no contiene el dominio DSL (Delta-Serrate-LAG2) que si presentan los ligandos canónicos de Notch en la región extracelular, y que es necesario para que se dé el reconocimiento y la interacción entre el ligando y el receptor [64, 111]. En su lugar presenta un dominio DOS (Delta y OSM-11) en su extremo N-terminal. Este motivo está presente en algunos ligandos canónicos de los receptores Notch, y en proteínas solubles o ancladas a membrana, que van a colaborar en la activación de la ruta de Notch con los ligandos que contienen el dominio DSL [66, 112].

DLK1 también es un marcador de células madre. Recientemente se ha demostrado la implicación de DLK1 en neurogénesis. La forma soluble de la proteína secretada por los astrocitos se une a la forma de DLK1 anclada en la membrana de las células madre neuronales, manteniendo así la capacidad de autorrenovación de las mismas [113]. También es un marcador de células

madre en hígado fetal humano [114], y además está implicado en el proceso de condrogénesis temprano a partir de células progenitoras [115].

## 2.5. Papel fisiológico de DLK1.

DLK1 está implicado en la diferenciación de varios tipos celulares a partir de progenitores mesenquimales derivados de médula ósea [116] (**Fig. 15**).



**Figura 15. Diferenciación de células madre mesenquimales (MCS) en varios tipos celulares.** Las células madre mesenquimales proliferan antes de diferenciarse en diferentes tipos celulares y tejidos mesenquimales. Estas células pueden diferenciarse en células de hueso, cartílago, músculo, estroma, tendones y tejido adiposo. Además son capaces de diferenciarse en tejidos de origen no-mesenquimal como hígado, corazón, piel y tejido nervioso.

Figura adaptada de Caplan y Bruder, 2001 (Ref. 116)

Estos procesos de diferenciación son:

- a) Hematopoyesis [117-120]. Dlk1 es un regulador muy importante en la proliferación de progenitores hematopoyéticos. El uso de una fracción soluble de DLK1 humano permite inhibir la diferenciación de células madre hematopoyéticas.
- b) Adipogénesis [121-125]. El adipocito es la célula especializada en acumular grasa y que puede ser utilizada en periodos de privación para obtener energía, por lo que el tejido adiposo es muy importante en el metabolismo energético. Además el adipocito puede liberar citoquinas implicadas en regular la homeostasis energética como la leptina y la adiponectina [126, 127] o citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleukina-6 (IL-6) [128].

El proceso de diferenciación de los adipocitos se encuentra gobernado por el receptor y activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) y la familia de factores de transcripción que son proteínas de unión al activador CCAAT (C/EBP), que se encuentran bajo el control de hormonas e interacciones célula-célula y célula-matriz [122]. Durante la diferenciación adipocitaria temprana C/EBP $\beta$  y D/EBP $\delta$  se inducen por dexametasona e isobutylmetilxantina respectivamente. Estos a su vez inducen PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  activando marcadores adipocitarios esenciales para la función del adipocito.

El proceso de diferenciación puede observarse in vitro en la línea celular preadipocitaria 3T3-L1, la cual se diferencia hacia adipocito maduro tras el tratamiento con el cóctel de diferenciación: insulina + dexametasona + metilisobutylxantina [129]. PREF-1 se expresa en elevados niveles en los preadipocitos, pero disminuye durante la diferenciación, debido a la dexametasona. Hay una correlación directa entre la disminución de PREF-1 y la eficiencia en el proceso de diferenciación en las células 3T3L1 [130, 131]. Finalmente está ausente en los adipocitos maduros, por lo que se utiliza como marcador de adipogénesis [92, 132].

PREF-1 se describió como inhibidor de la diferenciación adipocitaria [92, 122, 133, 134] impidiendo la acumulación de lípidos y la expresión de factores de transcripción implicados en el proceso de adipogénesis. Este

efecto inhibitorio es mediado por la forma soluble de mayor tamaño (50 KDa) [135], que es capaz de inducir el factor de transcripción Sox 9 a través de la activación de ERK. Este factor de transcripción se une a regiones del promotor de C/EBP  $\beta$  y  $\delta$  suprimiendo su transcripción [136]. Dlk1 no interacciona con Notch para realizar esta función sino que es capaz de interaccionar directamente con fibronectina mediante el dominio yuxtamembrana de Dlk1 y el dominio C-terminal de la fibronectina [137]. DLK1 activa las moléculas de señalización a partir de integrina, FAK y Rac, para activar MEK/ERK e inhibir finalmente la diferenciación adipocitaria [138]. Además los niveles de Dlk1 en los preadipocitos se pueden modular por miR-15a [139]

- c) Osteogénesis [140]. Se ha identificado Dlk1 como un regulador en la diferenciación del adipocito y osteoblasto de células madre mesenquimales humanas (hMSC). Se ha determinado la importancia de DLK1 en este proceso en modelos de ratón y enfermedades humanas caracterizados por la deficiencia o sobreexpresión de Dlk1, asociado con varios defectos en el desarrollo que afectan a cambios en el crecimiento y en la cantidad de grasa así como con malformaciones esqueléticas [141, 142].
- d) Diferenciación celular neuroendocrina [143]. En ratones deficientes en Dlk1 no se produce correctamente la neurogénesis postnatal en la zona subventricular [113]. En estados embrionarios tempranos Dlk1 se expresa en las células primordiales adrenogonadales [144].

Las células  $\beta$  del páncreas y las células somatotropas de la pituitaria producen hormonas circulantes bajo el control de señales que provienen del sistema nervioso. Las células  $\beta$  producen insulina en respuesta a niveles bajos de glucosa en suero, y las células somatotropas secretan la hormona de crecimiento (GH). Existe una correlación inversa entre los niveles de DLK1 en suero y GH. Así cuando hay niveles elevados de GH circulantes disminuye la cantidad de DLK1 soluble en suero. En cambio en preadipocitos de rata, la GH exógena impide la diferenciación adipocitaria inducida por la disminución de la expresión de DLK1.

La hormona de crecimiento ejerce muchos de sus efectos estimulando la producción de IGF-I, y la sobreexpresión de DLK1 disminuye la

señalización de IGF-I, lo que refleja la capacidad de DLK1 para disminuir GH [145, 146].

La placenta es otro órgano endocrino, implicado en el control del crecimiento fetal mediante la producción de factores de crecimiento y a través de la regulación de la transferencia de nutrientes al feto. DLK1 se expresa en las células endoteliales fetales.

- e) Diferenciación de hepatocitos [147]. DLK1 se expresa en hígado fetal. Es un marcador para hepatoblastos, que es el tipo celular progenitor común de hepatocitos y células epiteliales biliares.
- f) Diferenciación del sistema nervioso central y periférico. Se ha detectado la presencia de las isoformas FA1/dlk en el sistema nervioso central humano y de rata.
- g) Diferenciación de condrocitos. Se ha descrito DLK1 como un marcador de superficie para células madre progenitoras de los condrocitos, y se ha visto que esta proteína es fundamental para inducir la condrogénesis [115].

Además se ha encontrado la implicación de DLK1 en procesos de cierre de heridas donde se ha relacionado con el proceso de reparación de las mismas in vivo, ya que se ha detectado expresión de DLK1 en un tejido mesenquimal no diferenciado de la zona de reparación de tejido de la oreja de ratones MRL (Murphy Roth Large), que cura con mucha facilidad las lesiones infligidas regenerando sus células y C57BL/6 siendo en los ratones MRL donde más se expresa DLK1 y los que mayor capacidad de reparación tisular presentan [148, 149].

### 2.6. Papel fisiopatológico de DLK1.

Además DLK1 se ha implicado en varios procesos fisiopatológicos:

- a) Está implicada en riesgo y progresión en determinados cánceres en niños:

Neuroblastoma: es una forma de cáncer infantil que se origina a partir de progenitores de la cresta neural. Suele comenzar con mayor frecuencia en las glándulas suprarrenales, localizadas en la parte superior de los riñones. Más en concreto muchos de estos tumores se generan en la medula adrenal que está constituida principalmente por las células cromafines, responsables de la producción de noradrenalina mediante la dopamina  $\beta$  hidroxilasa (DBH) a partir de dopamina. Se ha descrito que la expresión de DBH se correlaciona con la expresión de DLK1 en líneas celulares de neuroblastoma, donde además un aumento de DLK1 da lugar a una población de precursores de células cromafines en la que no se ha completado el proceso de diferenciación [150].

Glioma: es una tipo de tumor que se origina en el cerebro o en la médula espinal y donde se ha encontrado una mayor expresión de DLK1 comparada con cerebros normales [151].

Tumor de Wilms o nefroblastoma: es una neoplasia maligna del riñón y el segundo tipo de cáncer abdominal más frecuente en niños. En esta patología se han encontrado sobreexpresados varios genes sujetos a impronta genómica, entre ellos Dlk1 [149, 152].

b) Está implicada en determinados tumores en adultos.

Se expresa en una subpoblación de células ovales hepáticas, que son consideradas como células madre/progenitoras en hígado de rata adulta [153]. En carcinoma hepatocelular (HCC) un 20,5% de los casos examinados fueron positivos para Dlk1, también en adenocarcinoma de colon (58%), en carcinoma de isletas pancreáticas (50%) y en carcinoma de pulmón (50%). De forma que Dlk1 es una proteína de superficie que se expresa en muchos carcinomas, incluidos HCC y puede ser una diana potencial para terapia de anticuerpos monoclonales para carcinomas [154].

Leucemia mieloide aguda (AML): es un tipo de cáncer producido en las células que normalmente madurarían hacia los diferentes tipos de células sanguíneas. En la mayoría de los casos se origina de células que se convertirían con glóbulos blancos, de forma que las células madre mieloides se convierten en un tipo de glóbulos blancos inmaduros. En muchos casos de esta enfermedad se ha encontrado

una sobreexpresión de DLK1 debido a una pérdida de la impronta genómica [155].

- c) DLK1 está asociada con hipertrofia muscular en un modelo de ratón en el que hay sobreexpresión [156]. Existe una mutación denominada Callipyge en ovino, en la que se detecta un aumento de los niveles de DLK1. Estos animales presentan una mayor masa muscular esquelética en los cuartos traseros donde se ha detectado un aumento en las fibras de tipo IIB de miosina [157]. En los ratones en los que hay sobreexpresión de DLK1 específica en músculo también hay un incremento en la masa total muscular y en el diámetro de las fibras a las 6 semanas de nacer.
- d) También podría haber una relación entre los niveles de DLK1 y los sujetos obesos. En concreto, se han detectado mayores niveles de la isoforma soluble (FA1) en suero de pacientes obesos [158].
- e) Al estar la expresión del gen de Dlk1 sujeta a impronta genómica, de forma que se expresa únicamente desde la copia heredada paterna, si se heredan las dos copias desde un único parental se desarrollan las disomias uniparentales del cromosoma 14 (UPD14). Dependiendo del origen de la copia parental se dan dos fenotipos diferentes:
  - UPD14 materna: que cursa con retraso en el crecimiento pre- y post-natal, pubertad precoz, hipotonía, retraso leve en el desarrollo, obesidad, articulaciones hiperextensibles, macrocefalia y escoliosis.
  - UPD14 paterna: tiene un fenotipo más severo que la materna y cursa con polihidramnios, anormalidades esqueléticas con desarrollo de brazos y piernas más cortos, torax estrecho y dificultad respiratoria, retraso mental de moderado a severo, escoliosis y rasgos faciales diferentes como por ejemplo orejas y ojos más pequeños.

La implicación de DLK1 en el contexto de la angiogénesis hasta el momento es que se ha detectado su expresión en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y mayores niveles de DLK1 en zonas de ramificación de la vasculatura durante el desarrollo en órganos vascularizados como páncreas, pulmón y glándula submandibular [97]. No se conoce si la modulación de los

niveles de la proteína puede afectar al proceso de formación de vasos, ni en condiciones fisiológicas ni en condiciones patológicas. Esta ausencia ha fundamentado el planteamiento de los siguientes objetivos:









### 3. OBJETIVOS

1. Estudiar la expresión de DLK1 en el contexto de la fisiología y fisiopatología del endotelio vascular.

2. Una vez determinada la expresión de DLK1 en células endoteliales de organismos de diferentes especies adultas (humana, bovina, porcina y murina), nos propusimos estudiar cuál es su papel en estas células. Decidimos centrarnos principalmente en el proceso de la angiogénesis por dos causas; primero por su hallazgo en el endotelio y segundo porque estaba descrito en la bibliografía como un ligando no canónico de la ruta de Notch, que es muy importante en la formación de la vasculatura. Para estudiar la implicación de DLK1 en el proceso de la angiogénesis utilizamos varias aproximaciones:

- a) Experimentos desarrollados in vitro mediante la formación de angiotubos por células endoteliales sobre una matriz de matrigel.
- b) Experimentos desarrollados ex vivo mediante explantes de anillos de aorta.
- c) Experimentos desarrollados in vivo mediante implantación de estructuras de matrigel “plugs”, estudio de la formación de vasos en el pez zebra y el estudio de la formación de la vasculatura en la retina del ratón.

3. Estudiar si los niveles de la proteína DLK1 afectan además al desarrollo de una vasculatura patológica, utilizando para ello un modelo de células tumorales en el pez zebra.

4. Una vez determinada la implicación de DLK1 en el proceso de angiogénesis, estudiar si los primeros procesos que se dan en la formación de los vasos, como son la migración, proliferación y apoptosis están también alterados.

## Objetivos

---

5. Elucidar cuál es el mecanismo molecular por el cuál DLK1 interfiere en el desarrollo de los vasos, y en particular su interacción con la ruta de Notch. Determinar el nivel de interacción con dicha ruta.

6. Estudiar si la ruta de TGF- $\beta$  puede verse también afectada por variaciones en los niveles de DK1.





## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### LINEAS CELULARES

**3T3-L1:** Son fibroblastos de embrión de ratón, que pasan de tener un fenotipo preadipocitario a diferenciarse a adipocitos. Esta diferenciación se induce por la confluencia, concentración de suero y presencia en el medio de cultivo de otros componentes, como son la insulina, isobutilmetilxantina y dexametasona. Se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM) + 10% suero de ternera recién nacida [159] + 1% penicilina/estreptomicina (P/S).

**HEK293A:** Se trata de una línea renal embrionaria humana utilizada para la producción, amplificación y titulación de adenovirus defectivos. Esta línea contiene una copia del gen E1 integrada de forma estable, que aporta las proteínas E1a y E1b necesarias para generar los adenovirus recombinantes. Se cultiva en D-MEM + 10% Suero Bovino Fetal FBS + 1% P/S.

**MLEC:** Son células endoteliales de pulmón de ratón. Estas células se aislaron a partir de los ratones de cepa 129 SvJ/XI control (WT) y de ratones carentes de Dlk1 (KO). Tras dislocación cervical se extrajeron los pulmones, se trocearon y digirieron con colagenasa al 0,1% en Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), hasta que se obtuvo una suspensión homogénea de células. Esta población celular mixta se sometió primero a una selección negativa con el anticuerpo FCsRII/III (CD16/CD32) para eliminar los macrófagos y a otra selección positiva posterior con el anticuerpo ICAM-2 (CD102) específico para células endoteliales. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG unido a bolas magnéticas, para poder capturar las células mediante un imán. Estas células se sembraron sobre una matriz de gelatina al 0,1%, fibronectina (10 µg/ml) y colágeno tipo I (20 µg/ml) preparada en PBS 1x y se cultivaron en D-MEM:Ham F-12 (1:1) + 20% FBS + Glutamina (2 mM) + Heparina + ECGF + P/S 1%.



**HUVEC:** Son células endoteliales de vena de cordón umbilical humano: tras canular la vena del cordón umbilical se realizó primero un lavado con buffer fosfato salino (PBS 1x), y después se digirió con colagenasa al 0,1% en HBBS durante 20 minutos a 37°. Posteriormente se recogieron las células endoteliales y se sembraron sobre una matriz de gelatina al 0,2% en PBS 1x.

**BAEC:** Son células endoteliales de aorta bovina: Tras lavar la aorta con PBS 1x, se perfundió con colagenasa al 0,1% en HBSS manteniendo clampados ambos extremos durante 20 minutos a 37°. Posteriormente se recogieron las células y se sembraron sobre una matriz de gelatina al 0,2% en PBS 1x. Se cultivaron en RPMI 1640 + 10% FBS + 1% P/S.

**PAEC:** Son células endoteliales de aorta porcina (PAEC): Esta línea fue generosamente cedida por el Dr. de la Pompa (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares – CNIC). Se cultivaron en D-MEM + 10% FBS + 1% P/S.

### **RATONES**

Los ratones controles y modificados genéticamente para la supresión de la proteína Dlk1 [160] fueron de la cepa 129 SvJ/XI y fueron cedidos mediante acuerdo de transferencia de material por el Prof. J. Laborda (Universidad de Castilla La Mancha).

### **REACTIVOS USADOS PARA LOS CULTIVOS CELULARES**

**L-Glutamina:** Aminoácido que complementa el medio de cultivo (GIBCO).

**PBS:** Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline). Contiene NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM y KCl 3 mM.

**FBS:** Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum) (Sigma)

**Tripsina:** Contiene EDTA. Se utiliza para despegar las células con el fin de procesarlas posteriormente (Sigma).

**Penicilina/Estreptomicina:** Antibióticos de amplio espectro contra bacterias gram-negativas y gram-positivas. 1000 unidades/ml de penicilina y 1000 unidades/ml de estreptomicina (PAN Biotech GmbH).

**Dulbecco's Modified Eagle Medium:** Medio de cultivo DMEM para las células 293A, los preadipocitos 3T3-L1 de ratón y las células endoteliales de aorta porcina (PAEC) (Gibco).

**RPMI1640:** Medio de cultivo para células endoteliales bovinas (BAEC) (Gibco).

**MCDB131:** Medio de cultivo para los anillos de aorta (Sigma).

**EBM-2:** Medio de cultivo para células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) (Sigma).

**DMEM/ F12:** Medio para preparar el medio de cultivo de células endoteliales de pulmón murinas (MLEC) (Gibco).

**HBSS:** Tampón utilizado para diluir la collagenasa (Merck).

**Fibronectina:** Proteína de matriz extracelular utilizada en el cultivo de MLEC (Sigma).

**Colágeno Tipo I:** Proteína de matriz extracelular utilizada en el cultivo de MLEC (Vitrogen 100).

**Gelatina Bovina (Sigma):** Proteína que contiene mezcla de diferentes tipos de colágeno utilizada para sembrar los cultivos primarios de BAEC, HUVEC y MLEC.

**Suero de ratón:** Utilizado en el medio de cultivo de los anillos de aorta.

## **ADENOVIRUS**

Los adenovirus que codifican GFP, DLK1-GFP (bicistrónico) o DLK1-HA se obtuvieron de Vector Biolabs. La línea celular HEK293A se utilizó para la amplificación de los adenovirus. Posteriormente, los adenovirus fueron purificados y titulados siguiendo las indicaciones de los correspondientes kits de Clontech (Adeno-X Maxi y Adeno-X Rapid Titer respectivamente).

**ANTICUERPOS**

| <b>NOMBRE</b>           | <b>TIPO</b> | <b>ORIGEN</b>    | <b>REFERENCIA</b> | <b>DILUCIÓN</b> |
|-------------------------|-------------|------------------|-------------------|-----------------|
| Anti-Dlk1               | Policlonal  | Abcam            | ab21682           | 1:1000          |
| Anti-NICD               | Policlonal  | Abcam            | ab8925            | 1:1000          |
| Anti-Hey                | Policlonal  | Santa Cruz       | sc-28746          | 1:1000          |
| Anti-Slug               | Polyclonal  | Santa Cruz       | sc-10436          | 1:500           |
| Anti- $\beta$ Actin     | Monoclonal  | Sigma            | A1978             | 1:10000         |
| FCsRII/III<br>CD16/CD32 | Monoclonal  | BD<br>Pharmingen | 553142            | 1:300           |
| ICAM-2<br>CD102         | Monoclonal  | BD<br>Pharmingen | 553325            | 1:300           |
| Ig-G Coated<br>Beads    |             | Invitrogen       | 110.35            | 1:100           |
| Anti-GFP                | Monoclonal  | Roche            | 11814460001       |                 |
| Anti-BrdU               | Monoclonal  | Abcam            | ab6326            | 1:100           |
| Anti-Rat<br>Alexa 488   |             |                  |                   | 1:200           |
| Anti-Rabbit             |             | IR Dye           | 926-32211         | 1:15000         |
| Anti-Mouse              |             | IR Dye           | 926-32220         | 1:15000         |
| Anti-Goat               |             | IR Dye           | 51003             | 1:15000         |
| Anti-HA                 | Monoclonal  | Roche            | 11867423001       | 1:1000          |

**Tabla 1. Anticuerpos**

VECTORES PLASMÍDICOS

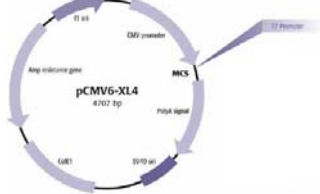
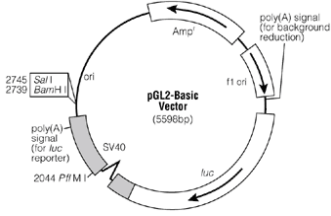
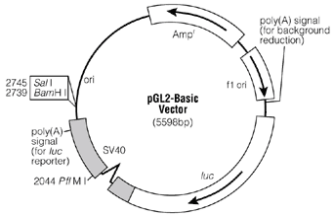
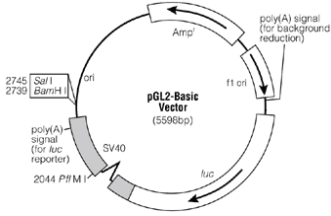
| PROTEÍNA | VECTOR  | CLON   |
|----------|---|--|
| Dlk1     |   | cDNA Humano<br>SC127962                                      |
| Hes-1    |   | 350 pb del<br>fragmento del<br>promotor de<br>ratón de Hes-1 |
| NICD     |  |  |
| Renila   |  |  |

Tabla 2. Vectores plasmídicos.

## **4.2 MÉTODOS**

### **ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA DE LAS MUESTRAS E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)**

Las células fueron lisadas con el buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NP-40 1%, Na-deoxicolato 0.5%, NaCl 150mM, EDTA 2mM, NaF 50mM) al que se añadió 1% dodecilsulfato sódico (SDS) y el cocktail inhibidor de proteasas (Mini-EDTA Complete- ROCHE). Se incubaron los lisados a 4° durante 30 minutos y posteriormente se homogenizaron mediante ultrasonidos. La concentración total de proteínas se determinó utilizando el ácido bicinonínico (BCA – BicinChoninic Acid). Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE) al 10%. Tras la electroforesis, las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), mediante transferencia en húmedo a 200 mA durante 2 horas. Posteriormente las membranas se bloquearon según el caso con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al 5% diluida en tampón salino tris (TBS), con detergente Tween 20 (Sigma) al 0,1% (TBS-T) o con leche al 5% diluida también en TBS con Tween 20 (TBS-T), durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubaron con los anticuerpos primarios a 4°C en BSA al 3% o leche al 3% diluidos en TBS-T durante toda la noche. Finalmente se realizó una incubación con el anticuerpo secundario en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de las bandas se realizó mediante el sistema de imagen de infrarrojo LI-COR Odyssey.

### **EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

Las células sembradas en monocapa se lavaron una vez con tampón fosfato salino (PBS 1x), y después se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total mediante fenol-cloroformo. Una vez purificado se determinó su concentración mediante absorción espectrofotométrica a 260 nm, así como la presencia de contaminantes estableciendo la relación  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ .

La retrotranscripción (RT, Reverse Transcription) para la obtención del ADN complementario se realizó mediante el kit comercial iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad) utilizando 1 µg del ARN. La reacción se llevó a cabo incubando primero a 42° durante 1 hora y a continuación a 70° durante 15 minutos.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real se realizó mediante el kit comercial Sso Fast Eva Green Supermix (Biorad) en un termociclador C1000 Thermal Cycler CFS96 de Biorad. Se utilizaron diferentes parejas de oligonucleótidos según el gen diana de interés, cuyas secuencias se recogen en la Tabla 3.

| PRIMER                                  | SECUENCIA                      |
|---|--------------------------------|
| <b>Dlk For Bovino</b>                   | 5' AGTGCCCATGGAGCTGAATG 3'     |
| <b>Dlk For Murino, Humano y Porcino</b> | 5' AGCACCTATGGGGCTGAATG 3'     |
| <b>Dlk Rev Bovino</b>                   | 5' CCGGATGTCTAGGTCACAGAG 3'    |
| <b>Dlk Rev Murino</b>                   | 5' CCGAACGTCTATTTCGCAGAA 3'    |
| <b>Dlk Rev Humano y Porcino</b>         | 5' CCGAACATCTCTATCACAGAG 3'    |
| <b>GAPDH For</b>                        | 5' GCCTGGTCACCAGGGCTGC 3'      |
| <b>GAPDH Rev</b>                        | 5' CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATGG 3' |
| <b>Hey For Murino</b>                   | 5' CACGCCACTATGCTCAATGT 3'     |
| <b>Hey Rev Murino</b>                   | 5' TCTCCCTTCACCTCACTGCT 3'     |
| <b>Snail For Murino</b>                 | 5' TCTGAAGATGCACATCCGAAGCCA 3' |
| <b>Snail Rev Murino</b>                 | 5' AGGAGAATGGCTTCTCACCAGTGT 3' |
| <b>Slug For Murino</b>                  | 5' AGATGCACATTCGAACCCAC 3'     |
| <b>Slug Rev Murino</b>                  | 5' GTCTGCAGATGAGCCCTCAG 3'     |

**Tabla 3. Primers para PCR**

Las condiciones de la PCR para la mayoría de los genes fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y anillamiento y extensión a 60°C durante 1 minuto. Al finalizar los ciclos de PCR se realizaron curvas de

desnaturalización (melting) para comprobar la amplificación de un único producto además de analizar por gel de agarosa para comprobar su tamaño.

Los datos se han analizado por el método de la cuantificación relativa por comparación de los Ct (umbral en el que comenzamos a detectar señal por amplificación), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad relativa de ARN} = 2^{\exp -(\Delta\Delta Ct)}$$

Donde  $\Delta Ct = Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del gen control interno}$ .

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ de la muestra calibradora} - \Delta Ct \text{ de la muestra desconocida}.$$

En los experimentos que se realizan en este trabajo la muestra calibradora es la muestra control (o procedente de animales WT), mientras que la muestra desconocida procede de células sometidas a tratamiento o de células procedentes de los animales genéticamente deficitarios para Dlk1. Como control interno se utilizó la GAPDH.

### **ENSAYO DE REENDOTELIZACIÓN EN PLACA (“Scratch Assay”)**

Se sembraron células endoteliales en placa de 24 pocillos. Una vez establecida la monocapa celular se realizó una incisión con una punta de pipeta. El cierre de la herida se monitorizó mediante microfotografía, tomando imágenes cada 30 minutos durante 24 horas. Se utilizó un microscopio Leica AF6000 LX con una cámara monocromática Hamamatsu CCD C9100-02 acoplada.

### **FORMACIÓN DE ANGIOTUBOS EN MATRIGEL**

Este ensayo está basado en la diferenciación de células endoteliales y la formación de estructuras de tipo tubular sobre una matriz extracelular de Matrigel (BD Bioscience) [161]. Es un ensayo muy rápido y reproducible, utilizado sobre todo para estudiar el papel de determinados componentes o moléculas en el proceso de angiogénesis [162]. Se realizó en placa de 96 pocillos añadiendo 40  $\mu$ l por pocillo de una matriz de Matrigel diluido 1:1 en medio 199. Después de 30 minutos a 37° se sembraron células endoteliales porcinas a una concentración de  $3 \times 10^4$  células por pocillo, en 0,1 ml de D-MEM con 10% de suero bovino fetal (FBS) ó células endoteliales de pulmón de ratón

a la misma concentración en medio D-MEM:F-12 (1:1) con 8% de FBS y 2 mM de glutamina con o sin VEGF (5ng/ml) (R&D System). Tras 5-6 horas de incubación a 37° los angiotubos se tiñeron con MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) (Sigma) durante 30 minutos. Se tomaron imágenes con objetivo 2x en un microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-U con una cámara digital acoplada. La cuantificación de angiotubos se hizo con el programa Angioquant y se confirmó el resultado mediante conteo manual.

### **EXPLANTES DE ANILLOS DE AORTA**

Para estudiar la angiogénesis en un modelo ex-vivo se cultivaron anillos de aorta en geles en tres dimensiones [163]. Para ello se sacrificaron ratones por dislocación cervical y se extrajeron las aortas torácicas que se mantuvieron en tampón fosfato salino (PBS 1x) a 4°. Se limpiaron las aortas del tejido adiposo que las rodea sin dañar las paredes del vaso, e inmediatamente se incubaron algunas con los adenovirus recombinantes a una concentración de  $1 \times 10^9$  ó  $5 \times 10^9$  upf/ml (unidades formadoras de placas/ml). Tras la incubación durante 4 horas a 37°, se embebieron anillos de 1 mm de longitud entre dos capas de matriz (Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences), en placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 100 µl de medio MCDB131 suplementado con 2,5% de suero de ratón, 1% de glutamina y 1% de mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina. Tras seis días de cultivo los explantes fueron examinados por el microscopio. La cuantificación se hizo midiendo la longitud de los vasos por anillo usando el programa ImageJ.

### **ENSAYO DE MATRICES TRIDIMENSIONALES (“PLUGS”) DE MATRIGEL**

Para el estudio de la angiogénesis in vivo se implantaron subcutáneamente estructuras de matrigel en la región abdominal de ratones C57/BL6. Dichas estructuras contenían una mezcla de 500 µl de matrigel bajo en factores de crecimiento sin rojo fenol (BD Bioscience) y heparina a 0,3 mg/ml (Sigma). Los correspondientes adenovirus (Ad. GFP, Ad. Dlk1 ó Ad. Dlk1-GFP), VEGF (250 ng/ml), un inhibidor de la ruta de Notch, DAPT 10 mg/kg peso del animal y DMSO (0,01%) fueron añadidos a la matriz según el caso.

Para la implantación del correspondiente “plug”, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (100 mg/kg de peso) y xilazina (10



mg/kg de peso).

Tras 10 días de la implantación del matrigel los animales fueron sometidos a eutanasia en cámara de CO<sub>2</sub>. Los “plugs” fueron extraídos y diseccionados y se midió el contenido de hemoglobina utilizando tetrametil bencidina (TMB, Sigma), donde este cromógeno se oxida mediante el peróxido de hidrógeno liberado por la actividad peroxidasa que posee el grupo hemo de la molécula de la hemoglobina.

En otro grupo de experimentos se extrajeron los “plugs” para los correspondientes análisis histológicos e inmunohistoquímico. Se fijaron mediante formaldehído y se embebieron en parafina. Se hicieron cortes para hacer tinciones con hematoxilina-eosina, y después se examinaron las muestras en microscopio en campo claro (Olympus DX50).

### **TRANSFECCIÓN CELULAR Y ENSAYO DE LUCIFERASA**

El plásmido de sobreexpresión de *Dlk1*, que contiene una copia de cDNA del clon humano de *Dlk1* (SC127962), se obtuvo de la casa comercial Origen (pCMV6 XL4). Con el fin de detectar la expresión de la proteína exógena se insertó una región señal (tag) de hemaglutinina. Para valorar el efecto de *Dlk1* sobre la función transcripcional de Notch se utilizó un plásmido que contiene 350 pb del promotor de Hes-1 de ratón seguido del gen reportero de la luciferasa en pGL2 basic [164].

Las células endoteliales (BAEC y PAEC) se cultivaron en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzada la confluencia del 60-70% se co-transfectaron con el plásmido del promotor de Hes-1 fusionado a la luciferasa, un vector de pGL2 que expresa la proteína Renilla como control de la transfección y el plásmido de expresión de *Dlk1*. Para ello se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y medio Optimem I. A las 4-6 horas se cambió el medio Optimem I por medio completo y se esperó 24 horas para leer el ensayo.

La actividad luciferasa se determinó mediante el kit “Dual Luciferase Reporter Assay System” (Promega). El resultado se expresó como n° de veces de inducción respecto a la transfección con los plásmidos control.

## **ENSAYO DE VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR**

El ensayo de viabilidad se realizó utilizando la sal de tetrazolio: sodio 2, 3, -bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazol (XTT, Cell Proliferation Kit II, Roche), que detecta las células metabólicamente activas, reduciéndose el XTT por las deshidrogenasas mitocondriales para generar como producto final una sal de formazán soluble en agua. La cantidad de formazán detectado por absorbancia se correlaciona directamente con el número de células activas metabólicamente en el cultivo.

Se sembraron células endoteliales con una densidad de 3000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se tomaron medidas a tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 horas tras la incubación durante 4 horas con XTT a 37°.

Para estudiar la proliferación celular se utilizó 5-bromo-2'- deoxiuridina (BrdU) que indica la proporción de células que están proliferando activamente, medida por la incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis. Se cultivan las células en medio que contiene BrdU y esta se incorpora en lugar de la timidina en la cadena de ADN de nueva síntesis. Se detectó mediante un anticuerpo anti-BrdU (1:100), seguido de un anticuerpo secundario anti-rata Alexa 488 (1:200).

A las 4, 8 y 24 horas se contaron las células positivas para BrdU por campo con un aumento de 40 veces, contando una media de 6 campos por muestra en tres experimentos por duplicado. Se tomaron imágenes con una cámara digital DS-2Mv acoplada a un microscopio invertido Nikon TE2000-U.

## **APOPTOSIS**

Para determinar el grado de apoptosis se utilizó la anexina-V, que es capaz de marcar las células en un estadio temprano de aquella, ya que es una proteína de unión específica al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. Para distinguir células vivas de células muertas, se combina con la tinción de núcleo AAD-7. Ello permite identificar células en apoptosis temprana (7-AAD negativas y PE-Anexina V positivas), células en apoptosis tardía o ya muertas (PE-Anexina y 7-AAD positivas), y células viables (PE-Anexina y 7-AAD negativas).

Para ello se trataron células MLEC obtenidas de ratones control (WT) y ratones carentes de *Dlk1* (KO) con 2,5  $\mu$ M de estaurosporina, que induce apoptosis mediante la inhibición de proteínas kinasa C, durante 2, 4, 8 y 19 horas. Se resuspendieron las células en 100  $\mu$ l de buffer de unión a anexina (0,1 M Hepes/NaOH (pH:7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ), 2.5  $\mu$ l de anexina V y 5  $\mu$ l de 7-amino-actinomicina (7-AAD). Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y después de añadieron 200  $\mu$ l de buffer de unión a anexina. El análisis de la apoptosis y necrosis se realizó mediante citometría de flujo (FACSCanto II High Throughput Sampler Option, Becton Dickinson).

### **AISLAMIENTO Y TINCIÓN DE RETINAS**

La angiogénesis en la retina del ratón es un modelo de desarrollo de una estructura vascular altamente organizada después del nacimiento. Debido a la posibilidad de monitorizar y manipular el proceso de angiogénesis retiniana durante el periodo postnatal, este modelo resulta adecuado para estudiar fenómenos como el de gemación (sprouting) y la organización morfogenética de las redes vasculares [165]. El ratón al nacer carece de vasculatura retiniana, desarrollándose esta en los siguientes 14 días. Al mismo tiempo que tiene lugar esta angiogénesis postnatal, los vasos hialoideos, formados durante la etapa embrionaria, involucionan y desaparecen. Todo este proceso presenta una regulación espacio-temporal muy estrecha que permite la manipulación experimental [166]. Por el contrario en el humano la vasculatura retiniana se desarrolla completamente durante el periodo de la gestación, de manera que a la semana intrauterina 40 ya está totalmente desarrollada.

Se sacrificaron ratones control (WT) y carentes de *Dlk1* (KO) de estadios P0-P14 mediante cámara de  $\text{CO}_2$  y se extrajeron los ojos que fueron fijados con paraformaldehído al 1% en PBS durante toda la noche a 4°. Las retinas fueron extraídas y tras ser lavadas con tampón fosfato salino (PBS 1x) se permeabilizaron con PBT (PBS + 0,1% Igepal, Sigma). Después se bloquearon con avidina/biotina (Vector) y con suero de cabra al 2% en PBT. Se marcaron con Isolectina B4 (*Griffonia simplicifolia*) conjugada con biotina para detectarla mediante Estreptavidina-647 Alexa Fluor (Invitrogen) [167]. Se tomaron imágenes de 8-10 retinas por grupo experimental mediante un microscopio confocal Nikon A1R. La cuantificación de células punta [168]

[168], filopodios y áreas vasculares se realizó mediante el programa ImageJ.

## **ENSAYO DE GANANCIA Y PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN PEZ ZEBRA**

El *Danio Rerio* (pez zebra) es un pez pequeño de aguas tropicales que vive en las riberas del norte de la India, norte de Pakistán, Nepal y Bhután en el sur de Asia. Debido a su pequeño tamaño y fácil cultivo, el pez zebra se ha convertido en un organismo modelo para el estudio del desarrollo del embrión. Su desarrollo es muy similar a la embriogénesis en vertebrados superiores, incluido el humano. A diferencia de los mamíferos, el desarrollo adulto transcurre fuera de la madre en huevos transparentes. Esto hace posible estudiar el desarrollo del embrión en su medio natural y permite observar la formación de los órganos internos dentro del organismo vivo.

El desarrollo del embrión es muy rápido: en las primeras 24 horas después de la fertilización todos los órganos principales están formados y en 2-3 días sale y comienza a buscar comida. Después de 3-4 meses son sexualmente maduros y pueden generar nueva descendencia. Una hembra puede poner 200 huevos/semana.

El tiempo de generación tan corto, el gran número de descendientes, la transparencia visual de los embriones y la similitud con los mamíferos en bastantes genes, son ventajas que hacen del pez zebra un modelo ideal para el estudio del desarrollo en vertebrados. Se han identificado en pez cebra un gran número de mutaciones que bloquean el desarrollo embrionario y muchas de ellas son útiles para el estudio de enfermedades humanas. Los organismos mutantes posibilitan una mejor comprensión de las redes genéticas que controlan el desarrollo de las especies vertebradas, incluyendo la humana.

Los ejemplares del pez zebra se mantuvieron y criaron en condiciones estándar a 28°. Se utilizaron embriones transgénicos *Tg(fli:EGFP)* y *Tg(gata1:dsRed)* para monitorizar el desarrollo de la vasculatura y el flujo sanguíneo respectivamente. El doble transgénico *Tg(fli1:ECGF)* y *Tg(gata1:dsRed)* se generó mediante cruces de las líneas individuales. El plásmido que contiene el cDNA de Dlk1 humano se inyectó a diferentes concentraciones en embriones en el estadio monocelular. Se utilizó el mismo plásmido vacío como control. Se tomaron imágenes de los embriones a las 72

horas post-fecundación (72 hpf) utilizando un microscopio de disección equipado con epifluorescencia (MZF16FA, Leica) y una cámara digital (DFC310FX, Leica).

Se diseñaron morfolinis antisentido (MO) (Gene-Tools, OR, USA), que son oligonucleótidos antisentido con anillos de morfolino que inhiben el comienzo de la traducción. En este caso está dirigido al codón de iniciación del gen *Dlk1* en el pez zebra (NCBI Reference Sequence: XM\_001921677.1): 5'-CCAAAACCTCACAGAAGCTCGTCAT – 3'. Como control se utilizó un morfolino con una secuencia al azar. Se inyectaron a 62.5, 125 y 250  $\mu$ M en embriones en el estadio mono o bicelular. Las fotografías fueron tomadas a 6 días postfecundación (6 dpf). Se analizaron 100 embriones por condición y experimento.

### **ENSAYO ANGIOGENESIS EN TUMOR XENOINJERTADO**

Se inyectaron mbriones *Tg(fli:eGFP)[169]* en el estadio monocelular con MO contra *zfDlk1*, *cap mRNA hDlk1* ó ambos, y se mantuvieron a 28°. Tras 24 horas a partir de la fertilización los embriones se incubaron con 0.2 mM de 1-fenil-2-tio-urea (Sigma) en agua, para impedir la pigmentación. A las 48 hpf se retiró el corion a los embriones y se anestesiaron con tricaina metanosulfonato (MS-222, Sigma). Se transfirieron los embriones a un gel de agarosa modificado para la microinyección.

Antes de la inyección se marcaron células tumorales in vitro durante 24 horas con 2  $\mu$ g/ml de 1,1-Dioctadecil-3,3,3'-tetrametillindocarbocianina perclorato (DiI, Fluka). Se resuspendieron las células en DMEM (Sigma) y se inyectaron 2-5 nL de la solución de células tumorales (25 células/nL) en la cavidad perivitelina de cada embrión utilizando un microinyector Eppendorf (FemtoJet 5247, Eppendorf). Los embriones inyectados se mantuvieron a 28° y se examinaron 2 días después para monitorizar la angiogénesis inducida por las células tumorales desde los vasos sub-intestinales utilizando un microscopio de fluorescencia (MZF16FA, Leica) equipado con una cámara digital (MZF16FA, Leica). Cada experimento, que incluye de 25-50 embriones, se repitió al menos 2 veces.

## **ENSAYO CON REPORTERO DE NOTCH EN PEZ ZEBRA**

El modelo *Tg(ptf1a:eGFP)jh1* es un pez zebra transgénico con un reportero que contiene 12 sitios de unión de la proteína de la ruta de Notch Rbp-Jk, delante del promotor mínimo de la  $\beta$ -globina y el gen reportero de la proteína verde fluorescente [170]. Los embriones *Tg(ptf1a:eGFP)jh1* se inyectaron en el estadio monocelular con MO contra *zfDlk1*, *cap* mRNA *hDk1* ó fueron tratados durante 36 hpf con DAPT durante 12 horas, y se permitió su desarrollo a 28°. 24 horas después de la fertilización se incubaron los embriones con 0.2 mM de 1-fenil-2-tio-urea (Sigma) para impedir la pigmentación. A las 48 hpf se tomaron imágenes de 5 embriones y se midió la luminosidad en el canal RBG de al menos 5 imágenes por experimento con AdobePhotoShop CS3 Extended (Adobe Systems Incorporated).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó mediante test no-paramétrico (test Mann-Whitney) en la mayoría de los experimentos. Cuando fue posible se aplicó un análisis paramétrico de t-Student o Análisis de varianza One-way según el caso.







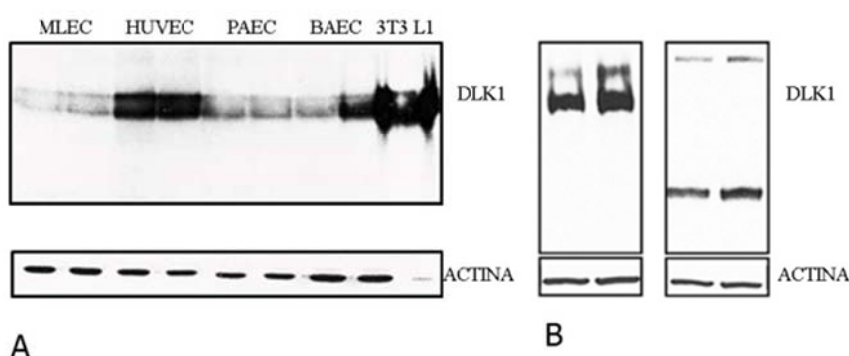


## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expresión de Dlk1 en endotelio vascular adulto.

Este gen se ha detectado en células progenitoras en varios tejidos durante la regeneración y podría tener un papel general en el mantenimiento de células en un estado indiferenciado. En el endotelio el único precedente es su marcada expresión en los vasos de la placenta [97]. Dado el escaso número de datos sobre Dlk1 y función vascular, nos planteamos estudiar su expresión y posible función en el endotelio vascular adulto.

El análisis mediante inmunoblot permitió detectar la expresión de Dlk1 en células endoteliales de organismos adultos en diferentes especies: murina, humana, porcina y bovina.

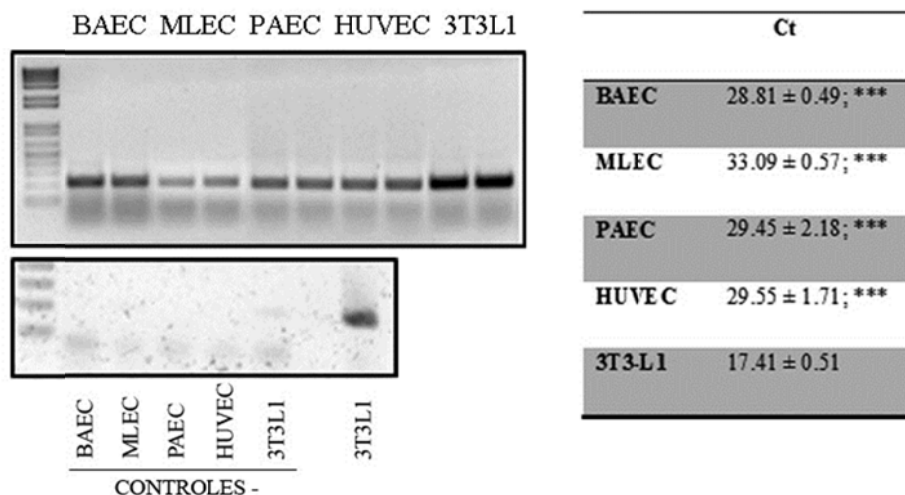


**Figura 16. Expresión de Dlk1 en células endoteliales de organismos adultos provenientes de diferentes especies.** Western blot de células endoteliales murinas de pulmón (MLEC), células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), células endoteliales de aorta porcina (PAEC) y fibroblastos de ratón 3T3-L1 (este último carril contiene cinco veces menos cantidad de proteína total) (A). Expresión del dímero (izquierda) y del monómero (derecha) en células endoteliales de aorta bovina (B).

Como control positivo se han utilizado células preadipocitarias 3T3-L1, donde está bien caracterizada la abundante expresión basal de esta proteína (**Fig. 16; A**). Además observamos también mediante western-blot la forma dimérica en lisados de células endoteliales bovinas adultas de muestras no hervidas (**Fig.**

**16; B, izquierda)** y la forma monomérica en muestras hervidas (**Fig. 16; B, derecha**).

También se comprobó la expresión del mensajero mediante RT-PCR (Retro Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real (**Fig. 17**).

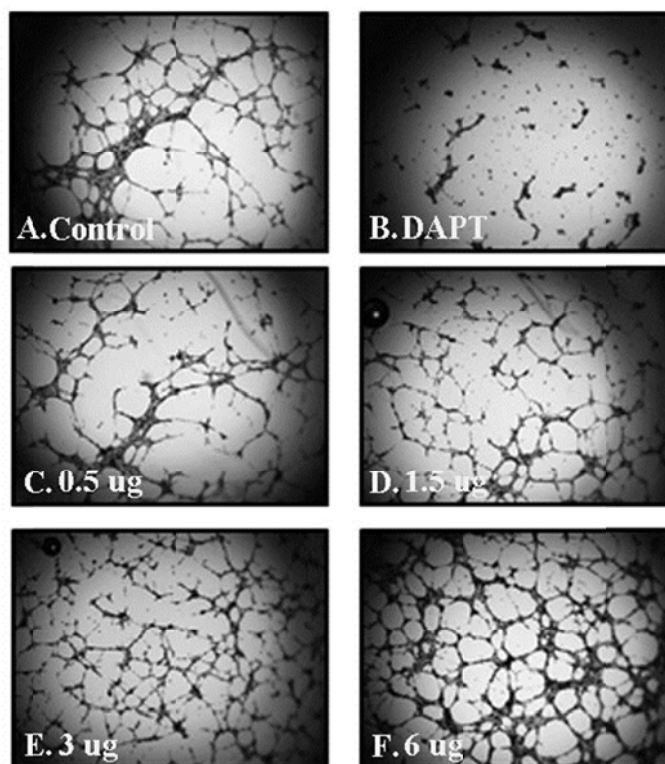


**Figura 17. Expresión de mRNA en células endoteliales de diferentes organismos adultos.** Gel de agarosa de RT-PCR en tiempo real de células endoteliales murinas de pulmón (MLEC), células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), células endoteliales de aorta porcina (PAEC) y fibroblastos de ratón 3T3-L1 (A). Cts de las diferentes líneas de células endoteliales. SEM±SD de organismo; \*\*\*p<0.001 vs 3T3-L1 (B).

## 5.2 Regulación de la angiogénesis por Dlk1.

### 5.2.1. Efecto de la ganancia y pérdida de función de la ruta de Notch sobre la formación de angiotubos.

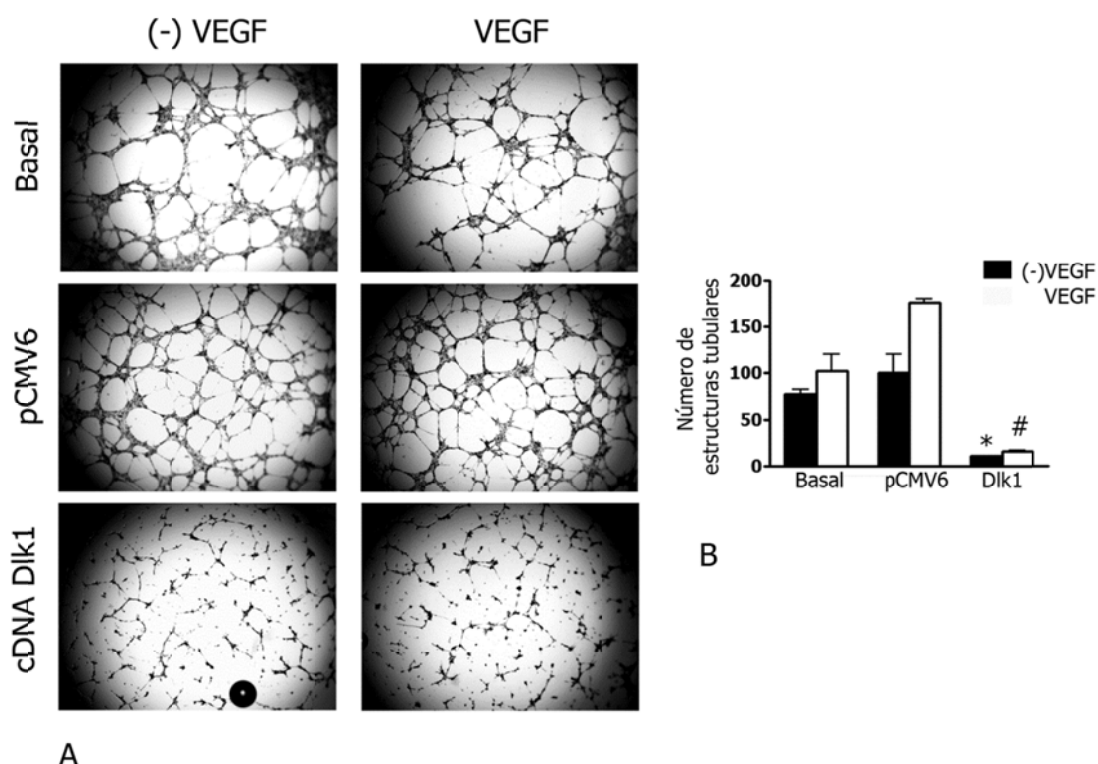
Para estudiar el efecto de la activación de la ruta de Notch en un ensayo de formación de tubos a partir de células endoteliales aisladas, se sembraron sobre matrigel células endoteliales de aorta porcina controles (PAEC WT) y transfectadas con dosis crecientes de la forma activa del receptor de Notch (dominio de Notch intracelular-NICD). Se observó un aumento en la formación de angiotubos que es dependiente de dosis. Cuando utilizamos el inhibidor común de la ruta de Notch; N-[N-(3,5-Difluorofenacetil-L-alanil)]-S-fenilglicina *t*-Butil Ester (DAPT), se inhibió la formación de estas estructuras (**Fig. 18.**).



**Figura 18. Formación de angiotubos en matrigel de células endoteliales porcinas.** Control (A), transfección con dosis crecientes (0.5, 1.5, 3.0 y 6.0 µg) de NICD (C-F) y tratamiento con DAPT (B).

### 5.2.2. La sobreexpresión de Dlk1 en células endoteliales inhibe la formación de angiotubos in vitro.

Debido a la detección de la expresión de Dlk1 en células endoteliales de organismos adultos y basándonos en su descripción estructural como ligando no canónico de la ruta de Notch, decidimos estudiar si podría desempeñar un papel en una de las funciones principales de dicha ruta, el proceso de angiogénesis.

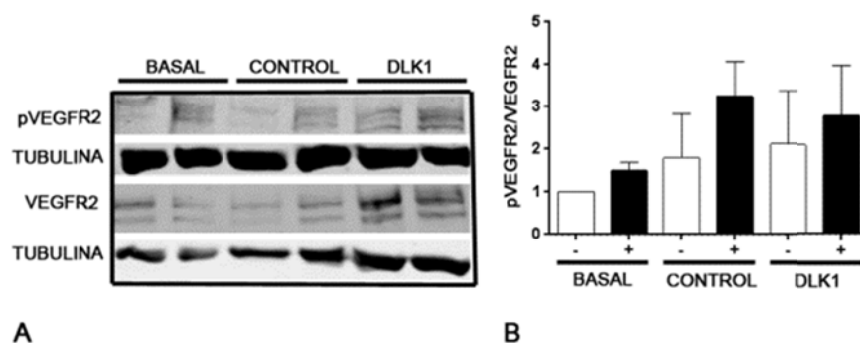


**Figura 19. Formación de angiotubos de células endoteliales de aorta porcina (PAEC) sembradas sobre matrigel.** Basal, transfectadas con plásmido control (pCMV6) y plásmido de sobreexpresión de cDNA de Dlk1 (A). Las gráficas representan la cuantificación del número de angiotubos en presencia y ausencia de VEGF de tres preparaciones independientes por grupo realizado por duplicado. Las barras representan la media $\pm$ SEM; \*,#  $p < 0.05$  (B).

Con el fin de estudiar el papel de DLK1 en este modelo, se realizó en primer lugar una aproximación in vitro. Para ello se estudió la capacidad de formación de angiotubos de las células endoteliales sembradas sobre matrigel.

En primer lugar, para estudiar el efecto del aumento de DLK1 sobre el proceso de angiogénesis, se transfectó un plásmido de sobreexpresión de Dlk1 y el plásmido vacío control, en líneas celulares endoteliales tanto bovinas como porcinas (**Fig. 19**). Las células transfectadas y células en condiciones basales se sembraron sobre matrigel y a las 4 horas se observó la formación de los primeros angiotubos. La sobreexpresión de DLK1 indujo una inhibición de la formación de angiotubos comparada con las condiciones basales y control, transfectadas con el plásmido control vacío (pCMV6) en ambos tipos de células endoteliales. Para averiguar si este proceso está afectado por VEGF, las células fueron tratadas con el mismo. El efecto de DLK1 sobre la formación de angiotubos se reveló independiente del VEGF, ya que la inhibición de la formación de estas estructuras persistió en presencia de dicho factor.

Para ver si DLK1 puede tener algún efecto sobre el nivel de fosforilación del receptor de VEGF, que es la ruta principal implicada en el proceso de angiogénesis, se analizó mediante western-blot los niveles de fosforilación del receptor de VEGF 2 cuando hay una sobreexpresión de la proteína. Como se puede observar no hay un nivel de fosforilación del receptor de VEGF 2 significativamente mayor al sobreexpresar DLK1 con respecto al control (**Fig. 20**).

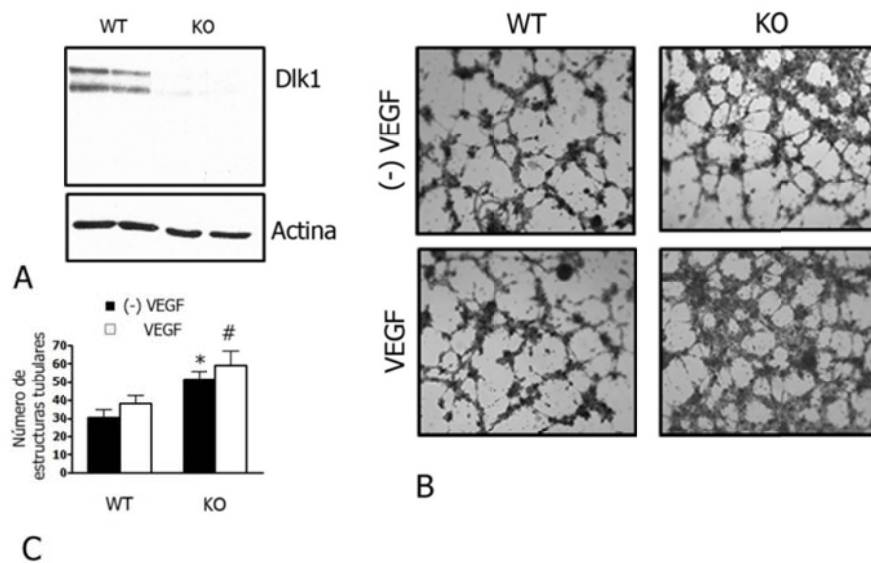


**Figura 20. Niveles de P-VEGFR2 por western blot en células endoteliales de aorta bovina.** La fosforilación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) no se ve alterada con la sobreexpresión de DLK1 (A). Cuantificación de la fosforilación del VEGFR2 (B). Media  $\pm$  SEM de n=3.



### 5.2.3. La ausencia de DLK1 se correlaciona con un aumento de la angiogénesis.

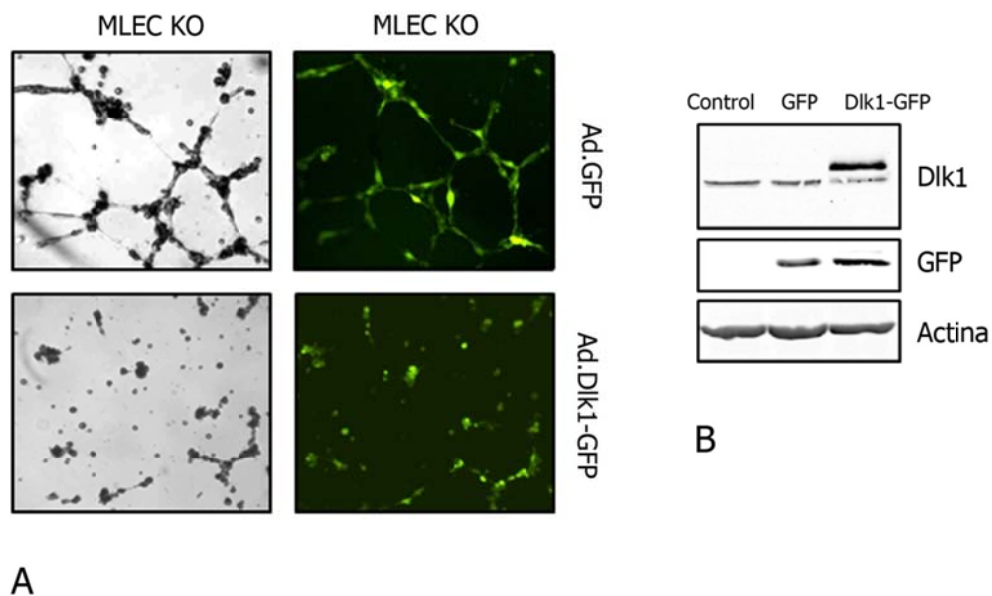
Con el fin de estudiar cómo la ausencia de DLK1 afecta al proceso de angiogénesis se aislaron células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) procedentes de ratones control (WT) y knockout (KO) para *Dlk1*, se sembraron sobre matrigel y se observó la formación de angiotubos tras 6 horas de incubación. Como muestra la figura 21, la formación de estas estructuras fue significativamente mayor en células procedentes del KO comparadas con las del WT. Para comprobar si el VEGF puede tener algún efecto sobre la formación de angiotubos en ausencia de DLK1, se realizaron los experimentos tanto en presencia como en ausencia de dicho factor. El VEGF favorece la formación de angiotubos tanto en células control como en células KO para *Dlk1*, pero se mantiene el efecto promotor de angiogénesis en las células carentes de *Dlk1*.



**Figura 21. Formación de angiotubos en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) a partir de animales control (WT) y knockout (KO) para *Dlk1* sembradas sobre matrigel.** Expresión de *Dlk1* por western-blot en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) controles (WT) y knockout (KO). La  $\beta$  actina se usó como control de carga (A). Imágenes representativas de células MLEC control (WT) y knockout (KO) para *Dlk1* sembradas sobre matrigel  $\pm$ VEGF tras 6 h (B). El análisis cuantitativo representa el número de angiotubos en las células control frente a las KO para *Dlk1* (media  $\pm$ SEM de n=3 por triplicado; \* p<0.05) (C).

Con el fin de revertir el fenotipo de las células endoteliales KO para Dlk1 sembradas sobre matrigel, se sobreexpresó la proteína mediante un adenovirus de Dlk1 que coexpresa la proteína verde fluorescente (GFP).

Tras 24 horas de incubación de las células endoteliales con el adenovirus control que sobreexpresa GFP, y el adenovirus que coexpresa DLK1 y GFP, se sembraron dichas células endoteliales sobre matrigel. En las células que sobreexpresan DLK1 se consiguió revertir el fenotipo, viéndose como se reduce la formación de los angiotubos comparada con las células MLEC KO transfectadas con el adenovirus control que sobreexpresa únicamente la GFP (**Fig 22**).



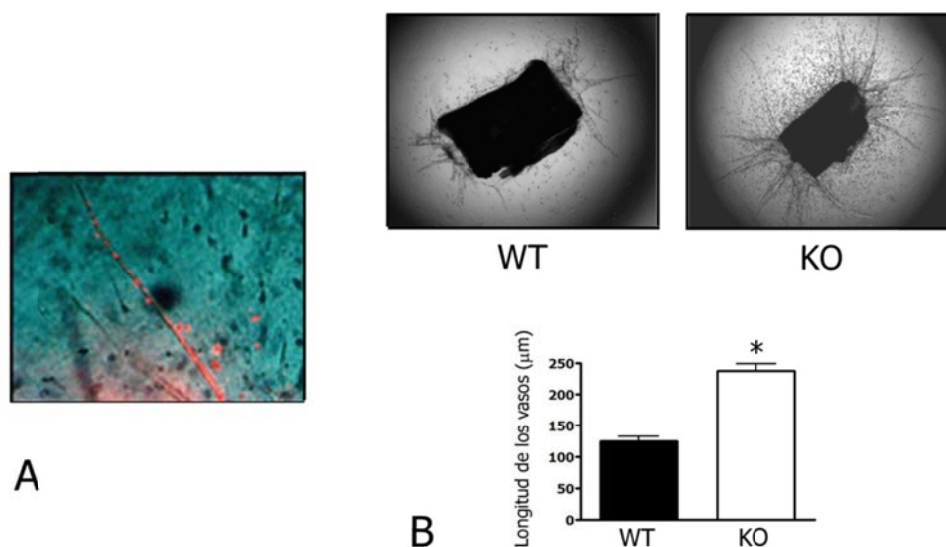
**Figura 22.** Formación de angiotubos inhibida por Dlk1 en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) knockout para Dlk1 sembradas sobre matrigel. Imágenes representativas de células endoteliales KO para Dlk1 infectadas con adenovirus que sobreexpresan GFP o Dlk1-GFP (A). Western blot mostrando la expresión de GFP y Dlk1-GFP en células endoteliales MLEC infectadas con adenovirus (B).



### 5.2.4. La ausencia de Dlk1 se correlaciona con mayor angiogénesis ex vivo.

Para comprobar la mayor capacidad angiogénica que presentaban las células endoteliales en los experimentos de matrigel in vitro, se realizaron ensayos de explantes de anillos de aorta. El modelo ex vivo de anillos de aorta se ha propuesto como uno de los más útiles para evaluar el proceso de angiogénesis. En este ensayo los anillos de aorta embebidos en los geles de colágeno dan lugar a una respuesta angiogénica que puede ser modulada por factores pro- o antiangiogénicos. El crecimiento angiogénico se compone de unas ramificaciones de microvasos formadas por células endoteliales en capa y rodeadas de células murales (células de músculo liso/pericitos) [171] .

En primer lugar y con el fin de demostrar que las células emergentes de los anillos de aorta y que forman los angiotubos son endoteliales, antes de seccionar, lavar y embeber en la matriz de colágeno los anillos de aorta, se incubaron las aortas con Dil-Ac-LDL.

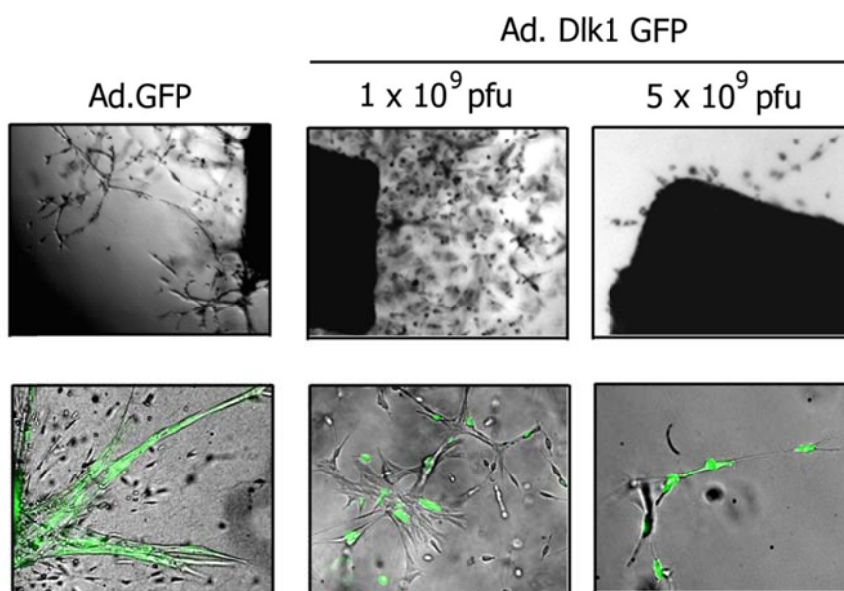


**Figura 23. Explantes de anillos de aorta de ratones control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 embebidos en matrigel.** Células endoteliales de angiotubos procedentes de anillos de aorta marcadas con Dil LDL (A). Fotografías representativas de la formación de vasos a partir de anillos de aorta de animales control o carentes de Dlk1 embebidos en matrigel tras 6 horas de cultivo. Cuantificación de la longitud de los vasos, los valores se representan como media±SEM de n=35 anillos de 6 ratones;  $p^* < 0.05$  (B).

Este reactivo es incorporado selectivamente a las células endoteliales sin afectar a su ratio de crecimiento [172] ni a la viabilidad celular. Cuando las células endoteliales se marcan con este compuesto, la lipoproteína es degradada por las enzimas lisosomales y la sonda fluorescente (Dil) se acumula en la membrana intracelular (**Fig. 23, A.**).

Una vez demostrada la naturaleza de dichas estructuras tubulares, se procedió a embeber anillos de aorta procedentes de ratones control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 en matrices de matrigel. Se observó un mayor número de angiotubos a partir de explantes de anillos de aorta de los animales KO para Dlk1 comparado con los animales WT. Asimismo la longitud de dichos tubos fue significativamente mayor en los explantes procedentes de los animales KO para Dlk1 (**Fig. 23B**).

La respuesta pro-angiogénica de estos animales KO se revirtió, de forma dosis dependiente, tras la preincubación de las aortas con partículas adenovirales que permiten la sobreexpresión de DLK1 durante 4 horas (**Fig. 24**).

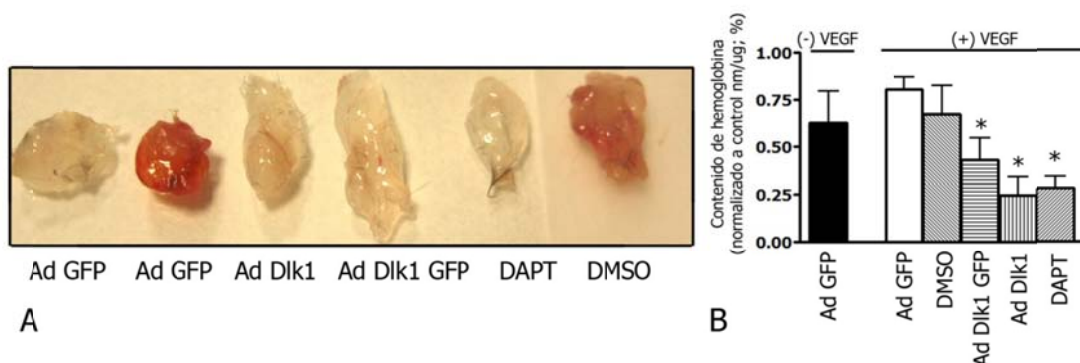


**Figura 24.** Explantes de aorta de animales knockout (KO) para Dlk1. Fotografías representativas de aortas preincubadas con partículas adenovirales control GFP, y de sobreexpresión de DLK1 con dos concentraciones diferentes.

### 5.2.5. La ganancia de función de Dlk1 también promueve la angiogénesis in vivo.

Para determinar in vivo el efecto de la sobreexpresión de Dlk1 sobre la angiogénesis se utilizó un método que permite determinar el potencial pro-angiogénico o anti-angiogénico de una determinada molécula. El método consiste en implantar Matrigel® en la zona ventral del ratón subcutáneamente, de modo que éste solidifica y forma un “plug” o estructura gelificada. Si previamente se introducen junto al matrigel componentes pro-angiogénicos, las células endoteliales del propio ratón migran hacia el “plug” formando vasos funcionales.

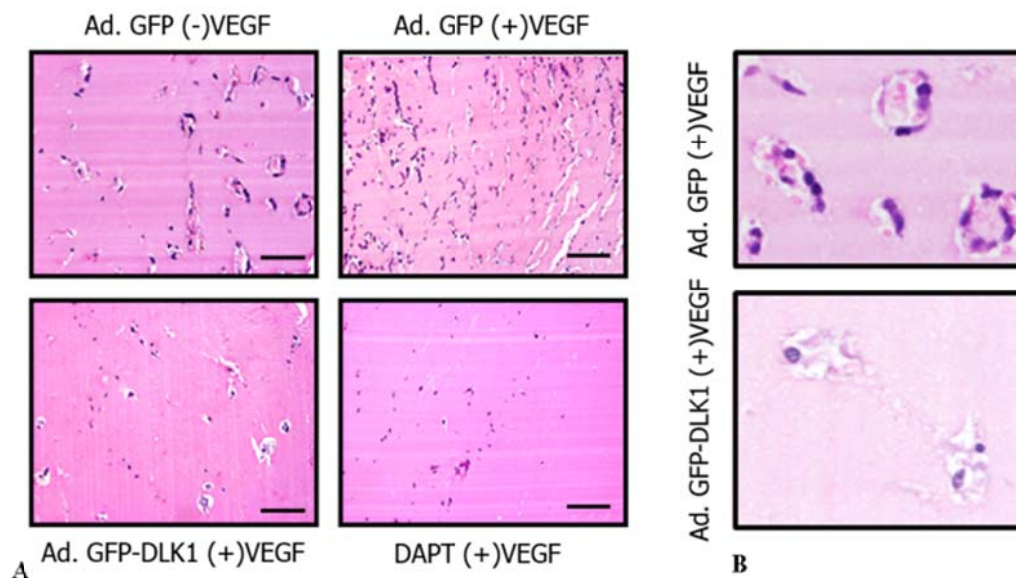
En estos experimentos se implantó en animales control C57, matrigel bajo en factores de crecimiento y sin rojo fenol, y en presencia de heparina (0,3 mg/ml por “plug”). En cada “plug” se incluyeron diferentes componentes estableciéndose de esta forma los siguientes grupos: adeno control GFP, adenos de sobreexpresión de Dlk1 (Dlk1 GFP y Dlk1 HA), el reactivo DAPT (inhibidor de la ruta de Notch) y su vehículo, DMSO. Todos los “plugs” contenían como factor pro-angiogénico el VEGF, excepto el grupo control negativo para verificar la efectividad del ensayo.



**Figura 25. Ensayo de angiogénesis in vivo mediante plugs de matrigel.** Se muestra una imagen representativa de la angiogénesis en plugs de matrigel después de 10 días de implantación (A). Cuantificación del contenido de hemoglobina de los plugs. Los valores representan media ± SEM de 6 ratones \* p < 0.05 frente a Ad GFP en presencia de VEGF (B).

Como se muestra en la figura 25, en el grupo control sin VEGF, la cuantificación de la angiogénesis mediante determinación del contenido de hemoglobina y estudio histológico, fue algo menor que en presencia de VEGF.

Por el contrario, la formación de vasos en los animales tratados con VEGF, se redujo drásticamente en los plugs que sobreexpresan Dlk1. Este efecto fue comparable al observado en los plugs tratados con el inhibidor de la ruta de Notch, DAPT (**Fig. 25**).



**Figura 26. Estudio histológico de la secciones de los plugs de matrigel implantados subcutáneamente (Hematoxilina-Eosina).** Se implantaron ratones C57 con plugs y se trataron con adeno GFP sin VEGF (control negativo), con VEGF (control positivo) y con el adenovirus de sobreexpresión de Dlk1 (Ad. GFP-DLK1) así como con el inhibidor de la ruta de Notch, DAPT. Barra de escala: 50  $\mu$ m. (A). Detalle de vasos formados en los plugs de matrigel de control positivo (Ad. GFP + VEGF) y en los plugs tratados con el Ad. GFP-Dlk1 (B).

Con el fin de analizar los angiotubos verosímilmente formados en los plugs, en otro grupo de experimentos se realizaron tinciones de cortes histológicos de los mismos con hematoxilina-eosina. En aquellos plugs en los que se había incluido el adeno-Dlk1, se observó una disminución en el número de vasos así como una desorganización estructural del plug. Se obtuvieron resultados similares con el inhibidor de la ruta de Notch, DAPT (**Fig. 26**).

Estos resultados apoyan la idea de que Dlk1 es capaz de inhibir el proceso de angiogénesis tanto in vitro (formación de angiotubos en matrigel), como ex vivo (explantes de anillos de aorta) e in vivo (implantación de plugs de matrigel). Por ello decidimos estudiar como Dlk1 puede afectar a procesos implicados en las primeras fases de la angiogénesis que incluyen la proliferación y la migración celular.

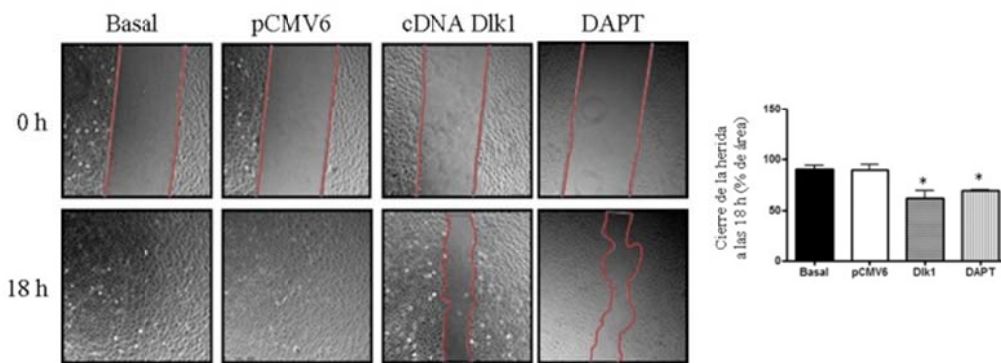
### 5.2.6. El proceso de re-endotelización en placa se retrasa significativamente por la sobreexpresión de Dlk1.

Como se ha descrito en trabajos anteriores [173] una disminución o una inhibición de la activación de Notch se asocia con una inhibición del crecimiento, migración celular y retraso de cierre de incisiones realizadas en monocapas celulares (scratch assay). Asimismo también existe un retraso en la re-endotelización de heridas realizadas en la piel de ratones transgénicos que expresan ADN antisentido para Notch o en animales tratados con inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa responsable del corte proteolítico y la activación de Notch [174].

Para comprobar si el ligando no canónico de la ruta de Notch, Dlk1, pudiera afectar la migración de las células endoteliales, se realizaron ensayos de re-endotelización o “wound healing” in vitro. Para ello se transfectaron células endoteliales bovinas con el cDNA de Dlk1 y se analizó el tiempo de cierre de las heridas tomando un video con una cámara monocromática Hamamatsu acoplada al microscopio durante 24 horas. El análisis demostró un retraso significativo en el cierre de la herida en aquellas células que sobreexpresaban Dlk1 comparado con las células en condiciones basales o con las transfectadas con un plásmido control. Este retraso se observó también tras el tratamiento con el inhibidor estándar de la  $\gamma$ -secretasa DAPT.



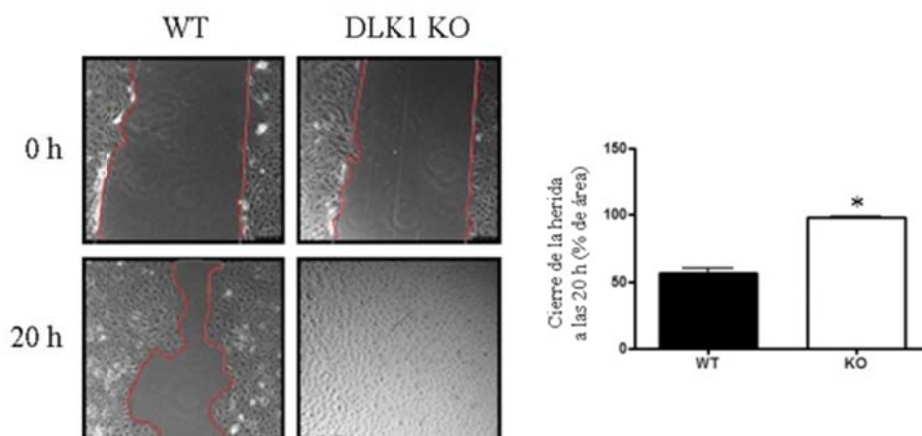
Se comprobó como a las 18h, en las condiciones basal y control la herida ya está completamente cerrada, mientras que en las condiciones de sobreexpresión con Dlk1 y tratamiento con DAPT está aún en proceso de cierre (Fig. 27).



**Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de Dlk1 en ensayo de migración sobre células endoteliales.** Se muestran imágenes representativas de células endoteliales en condiciones basales, expresando el vector control pCMV6, sobreexpresando Dlk1 y tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT, a tiempo cero y a tiempo de cierre de las heridas en las condiciones control. Las líneas rojas marcan el frente migratorio de las células endoteliales en la herida. El análisis cuantitativo representa el % de área en el tiempo de cierre de la herida (media  $\pm$ SEM de n=3 por triplicado; \*  $p<0.05$ ).

### 5.2.7. El proceso de re-endotelización en placa se acelera en ausencia de Dlk1.

Para comprobar si la carencia de Dlk1 tenía un efecto sobre el cierre de heridas, se sembraron células endoteliales KO para Dlk1 y controles, y se realizaron incisiones sobre las monocapas. Durante 24 horas se monitorizó la re-endotelización de la herida, tomándose fotografías cada 30 minutos. El cierre de la herida se produjo más rápidamente en las células carentes de Dlk1 comparado con las células control, siendo completo a las 20h. A este tiempo en las células control la herida aún permanecía sin cerrar (Fig. 28).



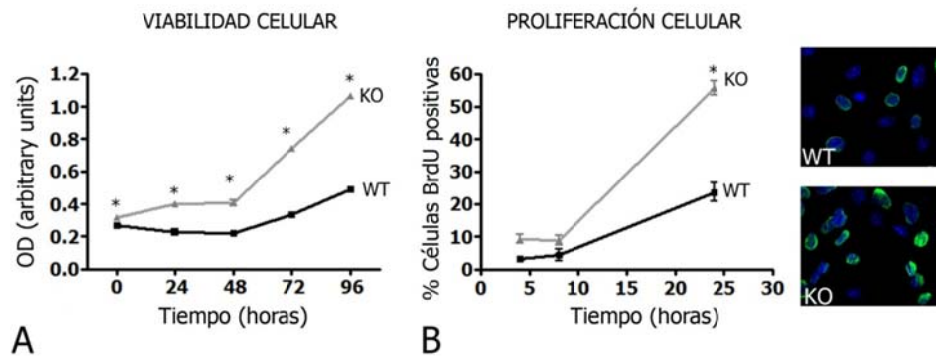
**Figura 28. Efecto de la ausencia de Dlk1 en ensayo de migración sobre células endoteliales.** Se muestran imágenes representativas de cierre de heridas en células endoteliales carentes de Dlk1 y células control. Las líneas rojas indican el frente de células endoteliales en el cierre de la herida. El análisis cuantitativo representa el % del área en el tiempo indicado del cierre de la herida (media  $\pm$  SEM de  $n=3$  por triplicado; \*  $p<0.05$ ).

### 5.2.8. Estudio de la proliferación, viabilidad y apoptosis en células carentes de Dlk1 respecto a células control.

Para determinar si las diferencias en la velocidad de re-endotelización podían deberse a cambios en la proliferación y/o apoptosis de las células al modificar los niveles de DLK1, se estudiaron la viabilidad, proliferación y muerte celulares en el contexto de pérdida de función de DLK1.

Para ello se sembraron células endoteliales provenientes de animales control y knockout para Dlk1 y se tomaron medidas a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas del cultivo. La medida de la absorbancia se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo.

La determinación de la proliferación celular se hizo mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) (**Fig. 29**).



**Figura 29. Viabilidad y proliferación en células WT respecto a células KO para Dlk1.**

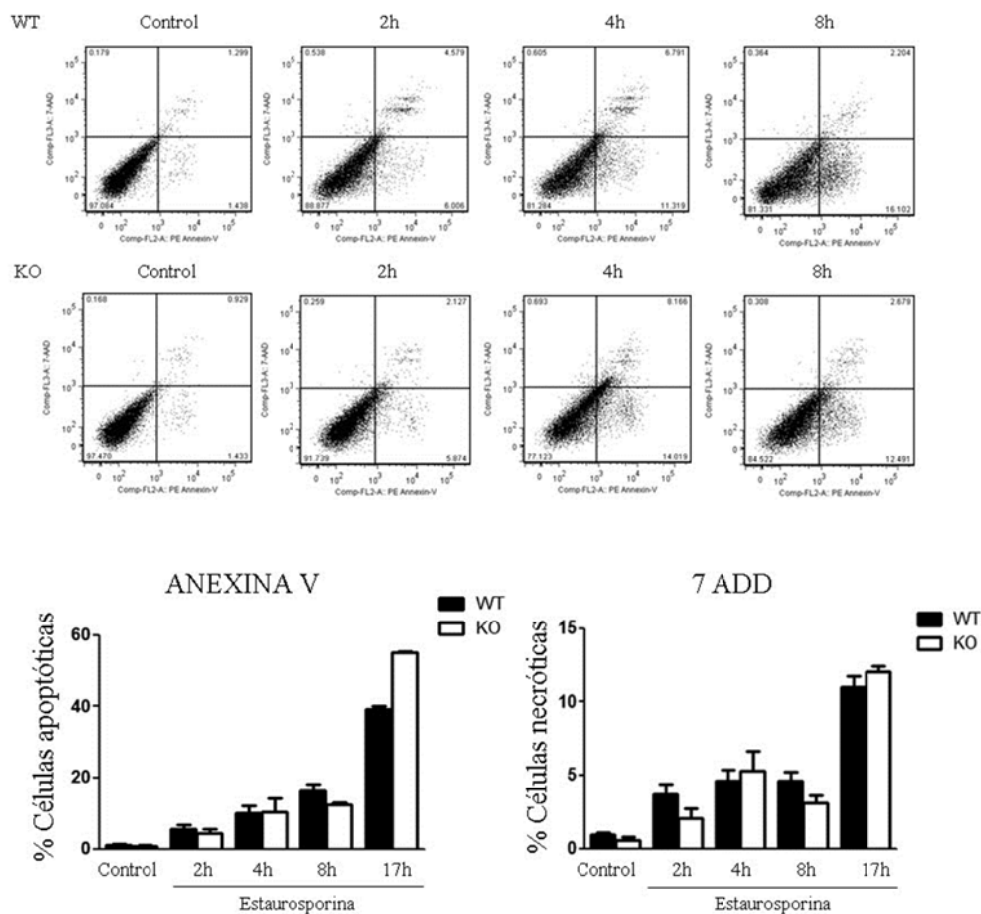
Estudio de la viabilidad celular mediante XTT a las 24, 48, 72 y 96 horas (A). Cuantificación de células BrdU positivas. Imágenes representativas de células control y carentes de Dlk1 a las 24 horas, BrdU [175] y DAPI (azul)- núcleos. Escala barra: 50  $\mu$ m. (B)

Se observó como en las células que carecían de Dlk1 había una mayor proliferación y viabilidad celulares que se reflejaron en mayores incorporación de BrdU y actividad metabólica mitocondrial (ensayo XTT).

Para comprobar si esta mayor proliferación en las células KO no se debía a una mayor apoptosis de las células control se hicieron experimentos con anexina V y el tinte vital 7-AAD (7-amino-actinomicina), tratando a las células con el compuesto pro-apoptótico estaurosporina.

Se comprobó que la ausencia de Dlk1 no afecta a la apoptosis con respecto a las células control (**Fig. 30**).



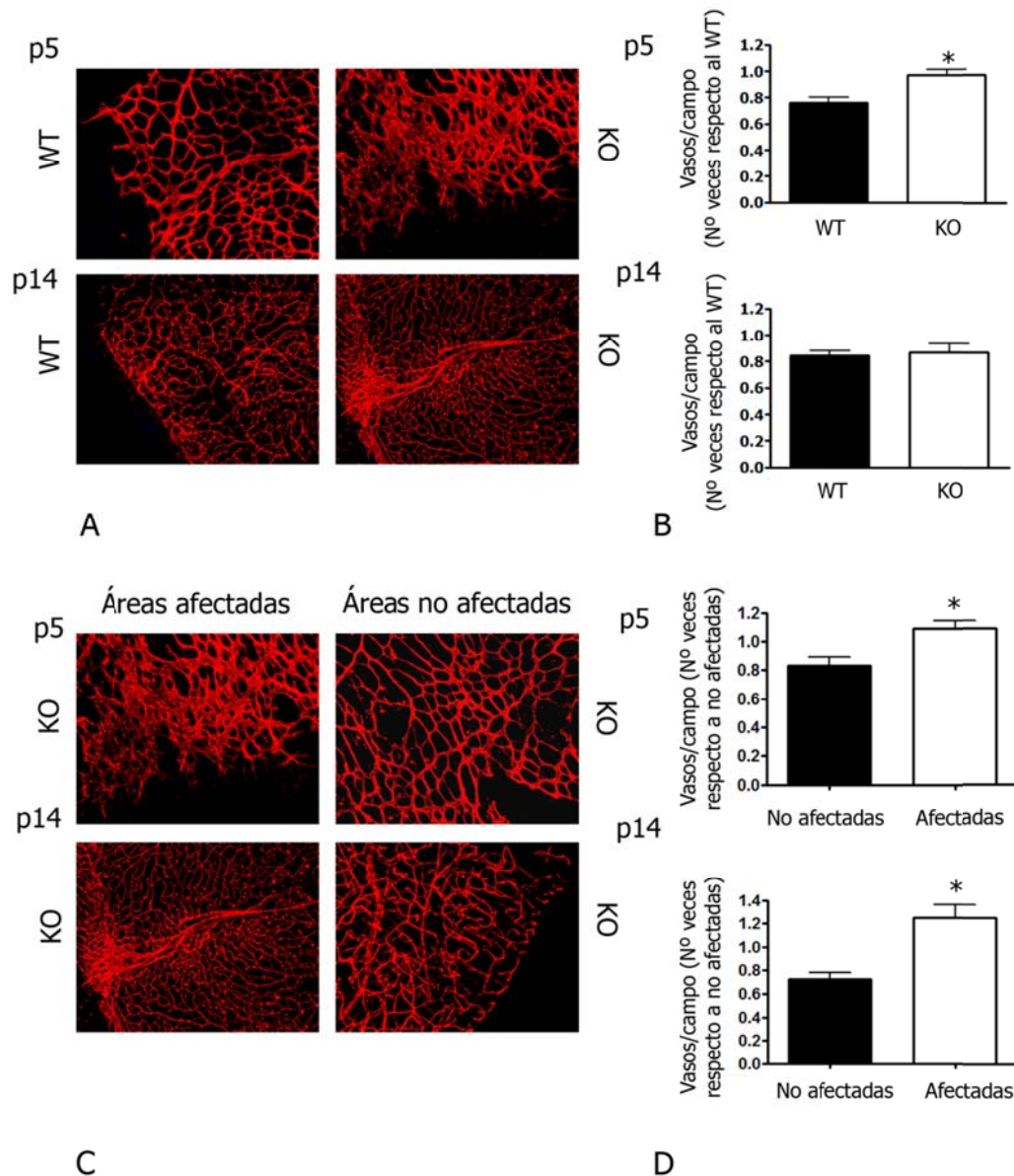


**Figura 30. Apoptosis en células WT y KO para Dlk1.** Se trataron células endoteliales de pulmón murinas controles y carentes de Dlk1 con 2,5  $\mu$ M de estaurosporina durante 2, 4, 8 y 19 horas. Después de la incubación con Anexina V y 7-Amino-Actinomicina (7-ADD), las células apoptóticas y necróticas (%) se analizaron por citometría de flujo. Las barras representan Media $\pm$ SEM.

### 5.2.9. La ausencia de Dlk1 promueve cambios en la arquitectura vascular de la retina.

Este modelo ha sido ampliamente utilizado para estudiar el papel de la ruta de Notch en el desarrollo de la vasculatura [45, 176, 177]. Para confirmar el papel antiangiogénico de Dlk1 in vivo se estudió la diferencia en la formación de vasos retinianos de animales controles y knockout para Dlk1 de 5 y 14 días de edad, cuando se está desarrollando y ya se ha desarrollado por completo la

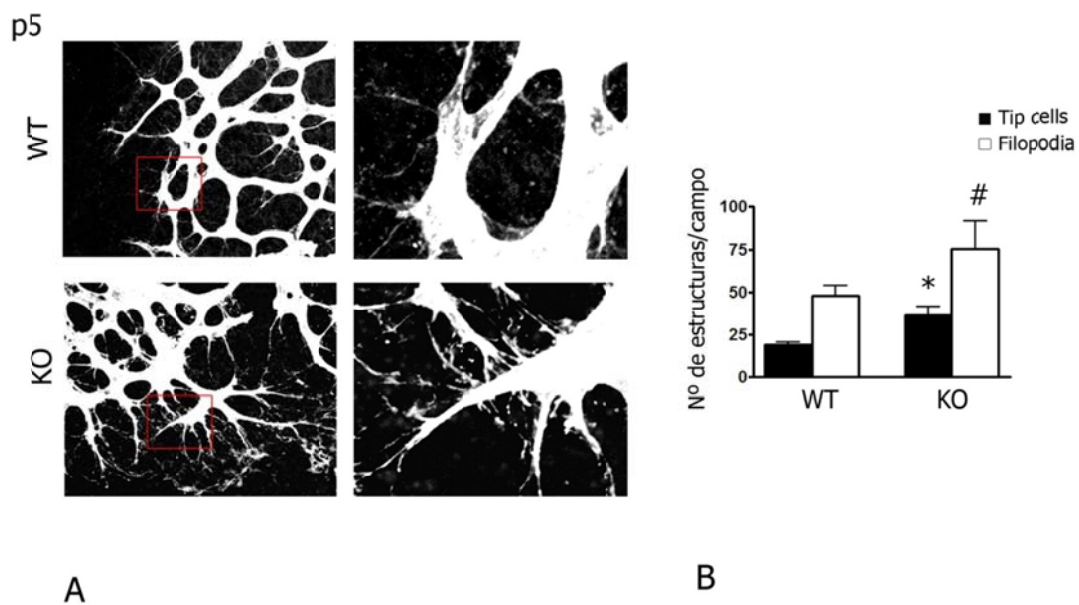
vasculatura respectivamente. Para identificar el endotelio se realizó un marcaje con isolectina B4.



**Figura 31. Angiogénesis retiniana en animales control (WT) y knockout (KO) para Dlk1 a 5 y 14 días del periodo postnatal.** Se muestran imágenes de microscopía confocal de retinas marcadas con isolectina B4 de animales WT y KO para Dlk1 a días 5 y 14 (A). Cuantificación del área de las retinas cubiertas por vasos a días 5 y 14. Media  $\pm$  SEM de 10 animales (\* $p < 0.05$ ) (B). Detalle de zonas hipervascularizadas en animales KO para Dlk1 a días 5 y 14 (C). Cuantificación de zonas hipervascularizadas frente a zonas no afectadas en animales KO para Dlk1 a días 5 y 14. Media  $\pm$  SEM de 10 animales (\* $p < 0.05$ ) (D).

Las retinas de animales que carecían de Dlk1 mostraron una hipervascularización en los estadios P5 y P14. En las retinas de los animales de 5 días estas zonas de mayor densidad de vasos se encuentran en el frente angiogénico, mientras que en los animales con 14 días la hipervascularización se encuentra en zonas localizadas dispersas por toda la retina. (**Fig 31**).

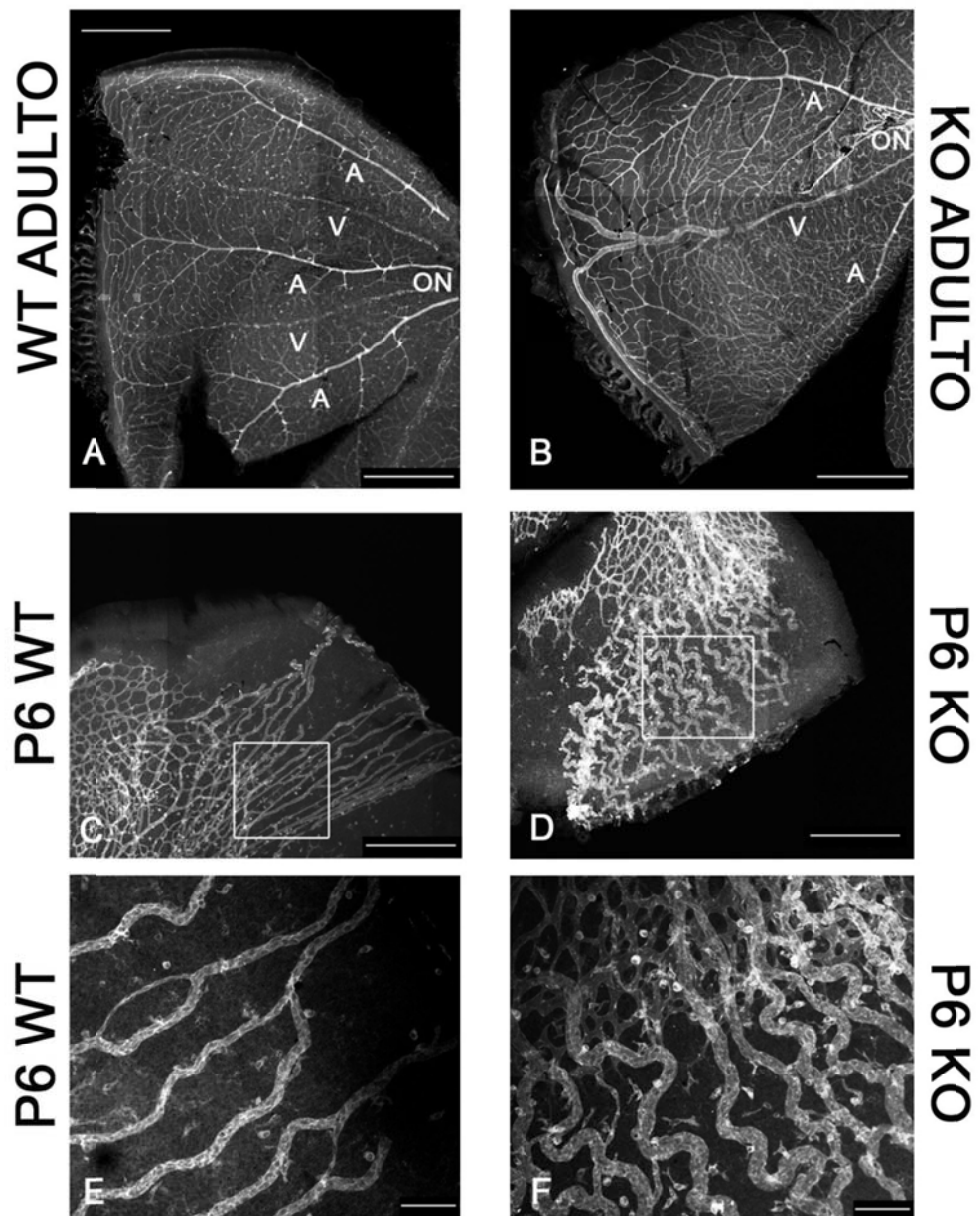
En el desarrollo de la retina del ratón el proceso de sprouting en la angiogénesis se correlaciona con la formación de células “tip” endoteliales y filopodios [178] . Un estudio detallado de las regiones afectadas de las retinas de los ratones knockout para Dlk1 muestra un aumento en el número de células “tip” y de filopodios, lo que sugiere una alteración en la regulación del proceso de angiogénesis (**Fig 32**).



**Figura 32.** Células tip y filopodios en el frente angiogénico de la retina. Detalle de células tip y filopodios de retinas marcadas con isolectina B4 de ratones WT y KO para Dlk1 (A). Análisis cuantitativo de células tip y filopodios (\* $p < 0.05$ ) (B).

### 5.2.10. La ausencia de *Dlk1* se asocia con dilatación de los vasos y con hemorragias.

Los vasos sanguíneos de la retina son rectos o ligeramente curvados en condiciones normales, pero en algunas enfermedades pueden observarse unos vasos tortuosos [179].

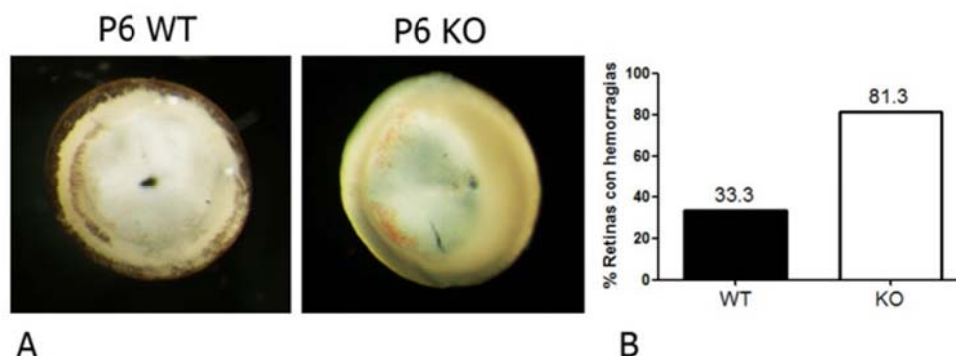


**Figura 33. Red vascular de la retina en ratones WT y KO para *Dlk1*.** Disposición arterio-venosa en ratones WT (A) y ratones KO para *Dlk1* (B) en ratones adultos. La arquitectura de los vasos hialoideos es más tortuosa en las retinas de los animales KO (D) para *Dlk1* comparada con los animales control, WT (C) en ratones de estado postnatal 6 días. Detalle de vasos hialoideos en las retinas de ratones WT (E) comparada con los KO para *Dlk1* (F).



Además cuando se analizaron a nivel macroscópico las retinas de los animales KO para *Dlk1* se observaron una serie de hemorragias que eran claramente visibles durante la extracción de dichas retinas.

Estas hemorragias aparecieron con una frecuencia del 81.3% en las retinas de los animales KO analizados y del 33.3% en las retinas de los animales control.



**Figura 34. Hemorragias en retinas de animales KO para *Dlk1* comparadas con animales control (WT).** Imágenes representativas de retinas de ratones WT y KO para *Dlk1* a día 6 postnatal tomadas a través de lupa (A). Cuantificación de retinas con hemorragias en % (n=16 retinas analizadas por grupo) (B).

La implicación de *DLK1* en angiogénesis se ha descrito durante el periodo embrionario, donde se ha relacionado su expresión con la formación de vasos sanguíneos, cerebro, placenta y en los puntos de ramificación durante la morfogénesis de determinados órganos [97].

Para analizar posibles diferencias en la formación de vasos en los ratones WT y KO para *Dlk1*, se hicieron cortes histológicos de la cabeza en embriones a estadio 12.5 días, cuando los niveles de *DLK1* son más altos en diferentes tejidos (glándula pituitaria, páncreas, pulmón, glándula adrenal y tejidos derivados del mesodermo) en el embrión [97].

En animales carentes de *Dlk1* se observaron vasos de mayor diámetro sin evidente correlato en los animales control. Algunos de estos vasos se localizaron en la región ocular, donde se han descrito niveles elevados de *Dlk1*, en relación con el desarrollo del nervio óptico (**Fig 35**).

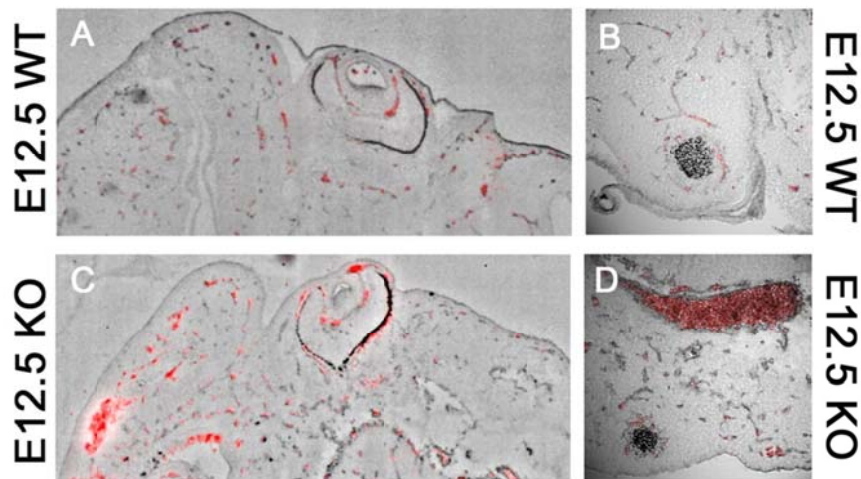
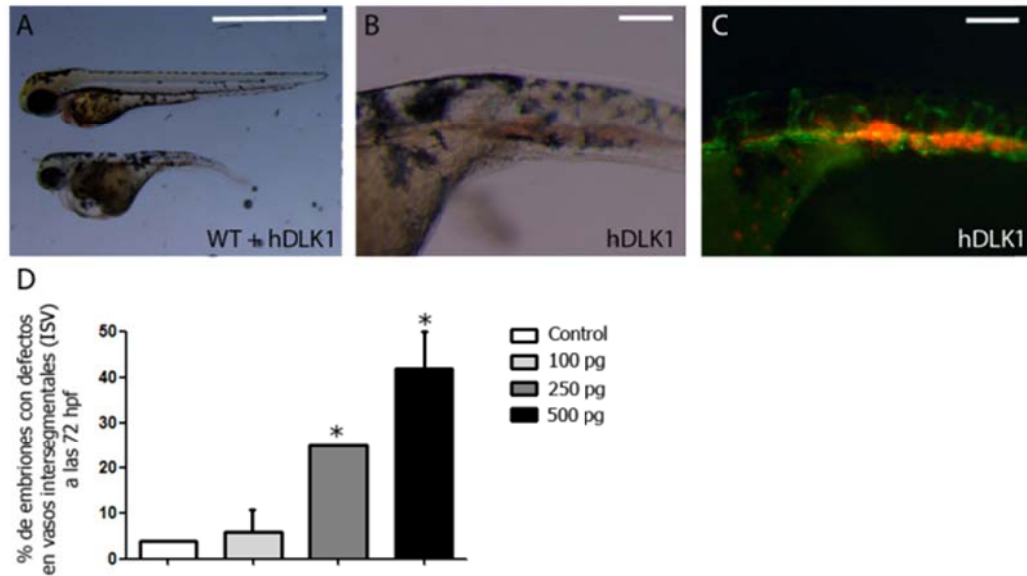


Figura 35. Secciones frontales de embriones a estadio 12.5 (E 12.5) teñidas con isolectina B4. Embriones control (A,B) y KO para Dlk1 (C,D). La autofluorescencia de los eritrocitos con el microscopio confocal se muestra en color rojo.

#### 5.2.11. Regulación de la angiogénesis por Dlk1 en el modelo de pez zebra.

Para conocer si la función de Dlk1 en angiogénesis es extensible a otros modelos de vertebrados, se realizaron experimentos en embriones de pez zebra.

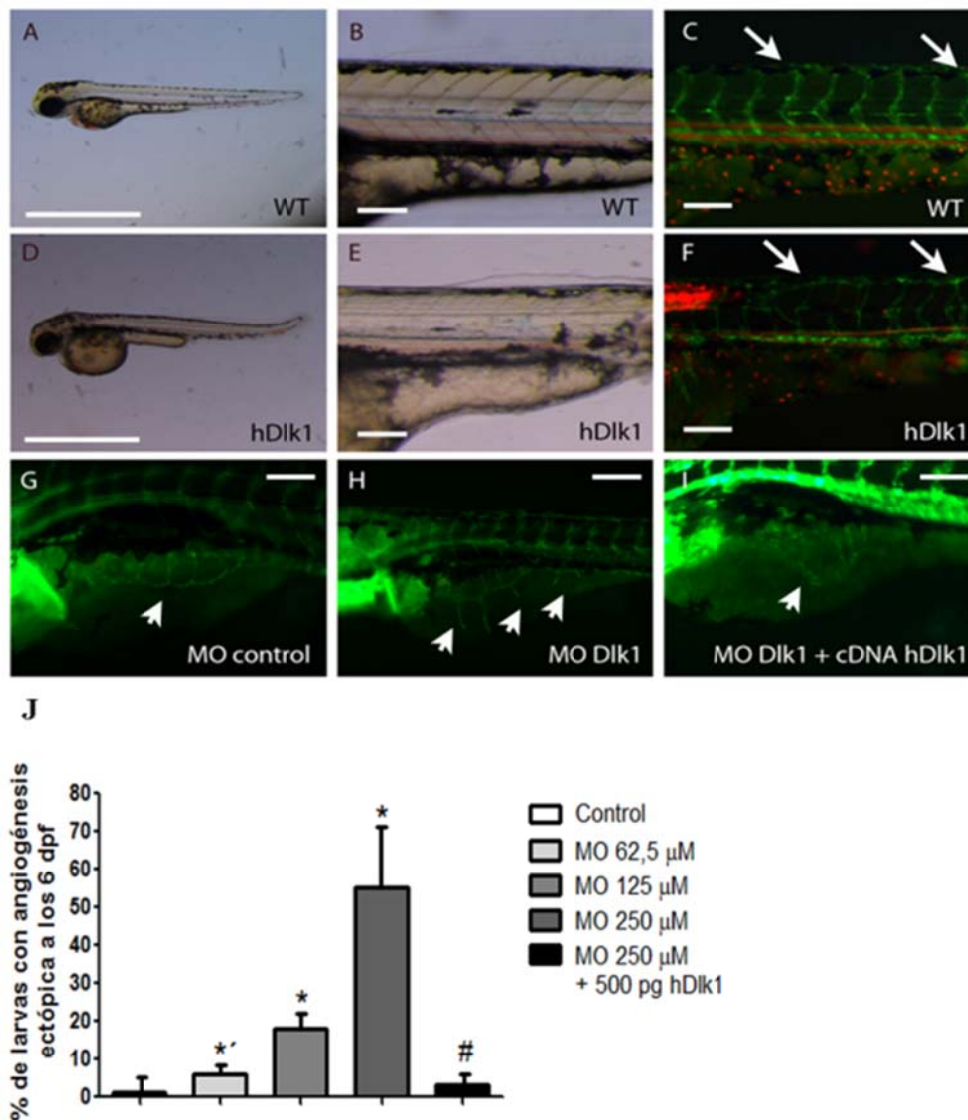
Para ello se inyectó ADN humano de Dlk1 con el fin de sobreexpresarlo en estado de embrión de una célula. Tres días después de la inyección, los embriones que expresan DLK1 muestran un patrón anormal de vascularización dorsal de Dlk1 dependiente de la dosis, consistente en conexiones aberrantes entre vasos intersegmentales y ausencia de vaso dorsal longitudinal (**Fig. 36**).



**Figura 36. Fenotipo de ganancia de función en pez zebra dosis dependiente de Dlk1.**

Tg(fli:eGFP); Tg (gata1:dsRED) embriones a 72h post-fertilización (A-C). Imagen de campo claro comparando morfología general en un embrión WT y un embrión inyectado con 500 pg de hDlk1 (A). Imagen en campo claro mostrando detalle de la cola del embrión inyectado con 500 pg de hDlk1 (B). Imagen de microscopia de fluorescencia que muestra yemas de arteria intersegmental y eritrocitos marcados con GATA-dsRED (C). Cuantificación del efecto dosis-dependiente en vasos intersegmentales en embriones inyectados con hDlk1 72 horas postfecundación (D). Cada condición incluye 100-300 embriones y cada experimento se repitió 2 veces. Las barras representan media $\pm$ SEM (\*p<0.05 vs control). Barra de escala: A: 2mm; B,C: 200  $\mu$ m.

Para comprobar la especificidad de Dlk1 en los resultados anteriores, el mRNA ortólogo del Dlk1 endógeno del pez zebra fue suprimido con un morfolino. Tras la inyección del morfolino, las larvas de 6 días mostraron angiogénesis subintestinal ectópica. Este fenotipo fue dependiente de la concentración de morfolino y se rescató por la co-expresión de Dlk1 humano (**Fig. 37**)



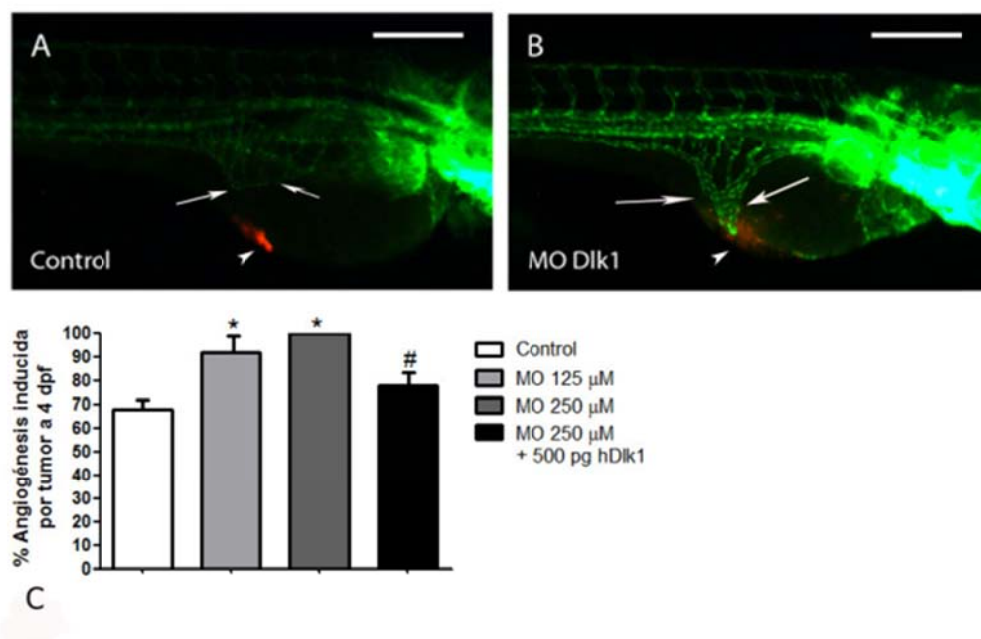
**Figura 37. Embriones WT de pez zebra.** Tg (fli:eGFP); embriones Tg (gata1:dsRed) a 72h de post-fertilización (A-F). Embriones Tg (fli:eGFP) a los 6 días post-fertilización (G-I). Imágenes en campo claro (A, B, D y E). Imágenes de microscopía de fluorescencia (C y F). Morfología general de embriones WT (A) y brotes de arterias intersegmentales, eritrocitos marcados con GATA-dsRED (B y C) de embriones WT inyectados con 500 pg de cDNA de plásmido control. Embriones inyectados con 500 pg de cDNA de Dlk1 (D-F). En (C) y (F), las flechas indican arterias intersegmentales. Embriones inyectados con 250  $\mu$ M de oligonucleótido MO control (MO control) (G). Brotes ectópicos de vasos intersegmentales en un embrión Dlk1 morfolino (H). Fenotipo después de la co-inyección de Dlk1 MO (MO Dlk1) y cDNA de Dlk1 (I). Cuantificación de angiogénesis ectópica en larvas de día 6 post-fecundación inyectadas con MO control, Dlk1 MO solo, o co-inyectadas con plásmido Dlk1 humano (hDlk1) (J). Las flechas identifican vasos intersegmentales y las puntas de flecha vasos subintestinales. Cada experimento, que incluye 100-300 embriones, fue repetido al menos dos veces. Las barras representan media $\pm$ SEM (\* $p$ <0.05 vs control; \* $p$ <0.025 vs control; # $p$ <0.025 vs MO 250 $\mu$ M). Barra de escala: A y D: 2mm; B, C y E-I: 200  $\mu$ m.



### 5.2.12. Regulación de la angiogénesis tumoral en el pez zebra.

Debido a la implicación que se ha visto de Dlk1 en el proceso de angiogénesis quisimos estudiar si también puede afectar a la formación de la vasculatura en un proceso patológico como la formación de tumores.

Para estudiar la angiogénesis tumoral en este modelo se utilizaron células tumorales de mamífero proangiogénicas, previamente marcadas in vitro con 1,1-dioctadecil 3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato, que se inyectaron en el espacio previtelino de embriones de pez zebra a las 48 horas post-fertilización. Tras 24-48 horas, esta población de células tumorales induce una respuesta proangiogénica que da lugar al desarrollo de vasos subintestinales.



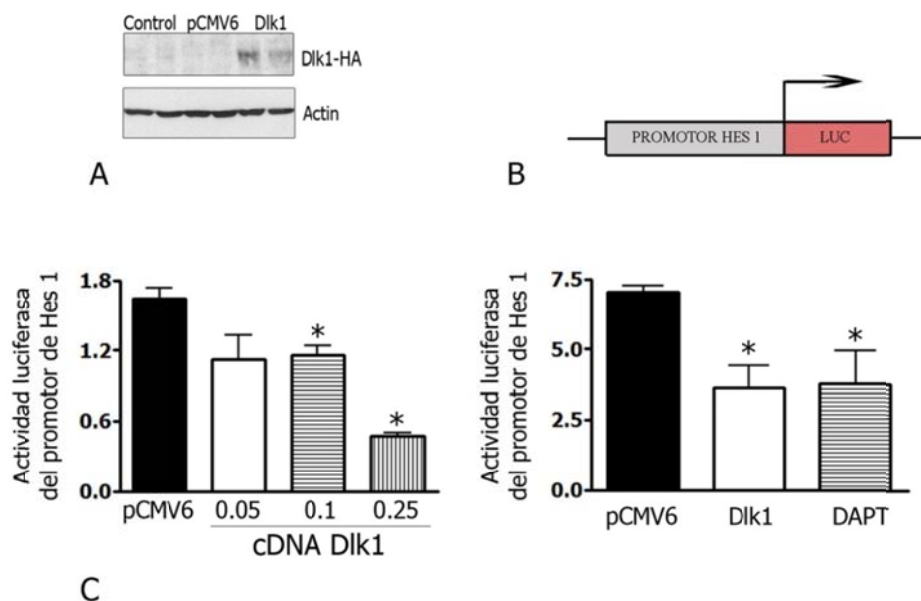
**Figura 38. Imágenes de microscopia de fluorescencia de larvas.** Control 4 dpf (días post-fecundación) (A) y larvas inyectadas con morfolino de Dlk1 en modelo xenograft a 2 dpf (B). Las flechas indican vasos intersegmentales y las puntas de flecha identifican células tumorales. Cuantificación de embriones que muestran angiogénesis inducida por tumor cuando se inyecta el morfolino comparado a Dlk1 a diferentes concentraciones o coinjectado con mRNA de Dlk1 humano capeado (C). Cada condición incluye 25-50 embriones, y se repitió 2 veces. Las barras representan media $\pm$ SEM (\* $p$ <0.025 vs control; # $p$ <0.025 vs morfolino 250  $\mu$ M). Barra de escala: 200  $\mu$ m.

La supresión de Dlk1 mediante morfolino dió lugar a una migración incrementada y llamativa de vasos hacia la masa tumoral, que fue revertida por la co-inyección con el mRNA humano de Dlk1, demostrándose así la especificidad del Dlk1 (**Fig. 38**).

### 5.3 Interacción de DLK1 con la ruta de Notch.

#### 5.3.1. DLK1 disminuye la expresión del gen reportador de luciferasa de Hes-1.

Dlk1 fue uno de los primeros ligandos no canónicos de la ruta de Notch descritos [92, 180, 181], muy similar estructuralmente a los ligandos canónicos. Se ha descrito que Dlk1 interacciona con el receptor de Notch, actuando como un inhibidor de la señalización [182-184], ya sea a través de la forma soluble o de una forma anclada a membrana resistente a ADAM que posee mayor potencia inhibitoria [183].



**Figura 39. Efecto de Dlk1 sobre la actividad del promotor de Hes-1.** Sobreexpresión de Dlk1 en células endoteliales (A). Actividad luciferasa del promotor de Hes 1 (B) en células endoteliales transfectadas con Dlk1 a diferentes dosis y tratadas con el inhibidor de la ruta de Notch, DAPT (C). Las barras representan la media±SEM; \*  $p < 0.05$ .

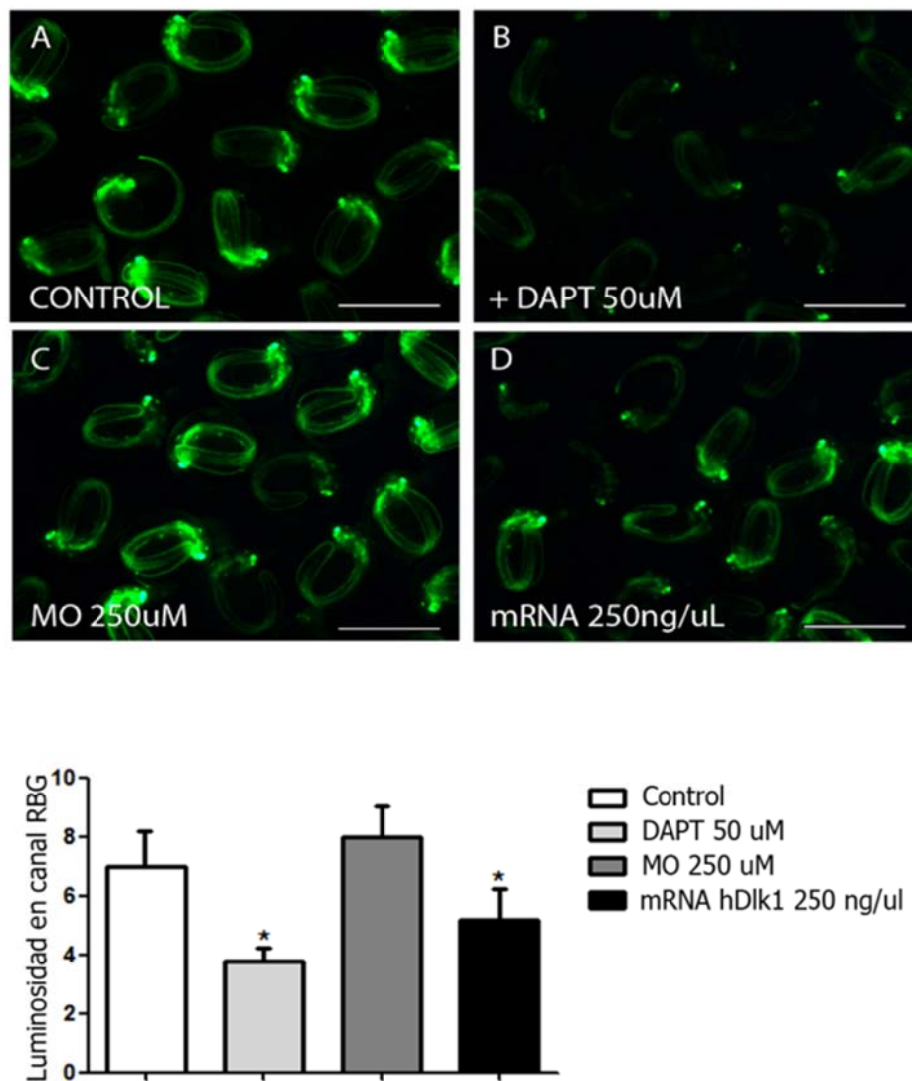
Para estudiar el nivel de activación de la ruta de Notch utilizamos una de las proteínas finales implicadas en la activación de la ruta de Notch, Hes1. Para ello se utilizó una construcción que contiene una secuencia de 350 pb del promotor murino de Hes-1 fusionada al gen reportador de la luciferasa, de forma que es posible monitorizar la actividad transcripcional del gen diana (**Fig 41 B**).

Para ahondar en la posible interacción entre DLK1 y la ruta de Notch, se sobreexpresó DLK1 en células endoteliales de aorta bovina o porcina, mediante plásmidos de expresión de Dlk1 anclado al epítipo de hemaglutinina (HA) (**Fig 41 A**). Al sobreexpresar DLK1 en ambos modelos de células endoteliales se observó una inhibición dependiente de la concentración sobre la diana final de la ruta de Notch, Hes-1 que fue similar al nivel de inhibición observado con el tratamiento del inhibidor DAPT (**Fig 41C**).

### 5.3.2. Dlk1 disminuye la expresión del reportador RbpJK in vivo.

Para comprobar si Dlk1 inhibía la ruta de señalización de Notch en otro modelo se utilizaron embriones del pez zebra que expresaban el efector fluorescente RbpJk, y que también es diana de la ruta de Notch.

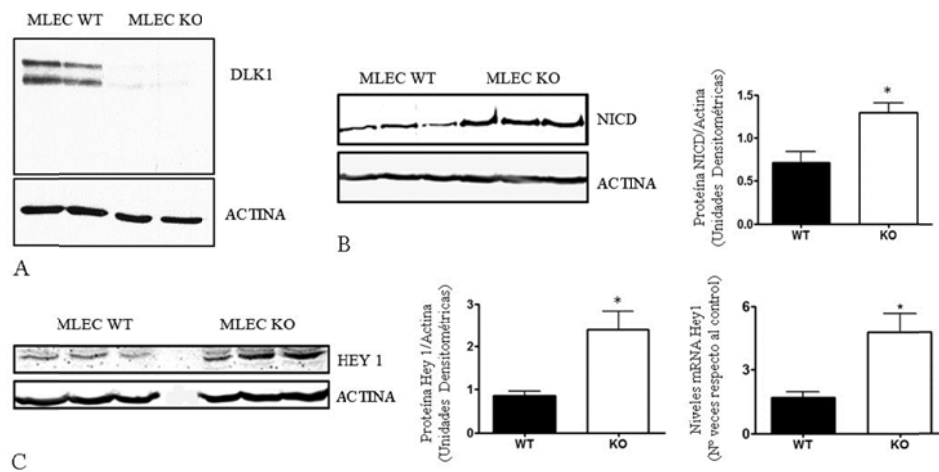
Como se observa en la figura 41B el inhibidor de Notch, DAPT, redujo drásticamente la fluorescencia comparada con el control. En consistencia con esta observación, al antagonizar Dlk1 mediante un morfolino (MO) se consiguió aumentar ligeramente la fluorescencia asociada a RbpJk (**Fig 41 C**). Por el contrario al inyectar embriones de pez zebra con el mRNA de hDlk1 se detectó una disminución de la señal asociada a la ruta de Notch (**Fig 41 D**).



**Figura 40. Pez zebra que expresa el elemento de respuesta a Notch (Tg(ptf1a:eGFP)jh1) a los 2 días postfecundación.** Control (A), tratados con DAPT a 50  $\mu$ M durante 12 horas (B), inyectados con MO Dlk1 (D), inyectados con mRNA Dlk1 (D). Cuantificación de la luminosidad de las figuras en el canal RBG para las diferentes condiciones (E). Las barras representan la Media $\pm$ SEM de 3 preparaciones diferentes. (\*p<0.01 vs control; \*p<0.01 vs control; #p<0.05 vs MO 250  $\mu$ M).

### 5.3.3. La ruta de Notch está activada en células endoteliales carentes de Dlk1.

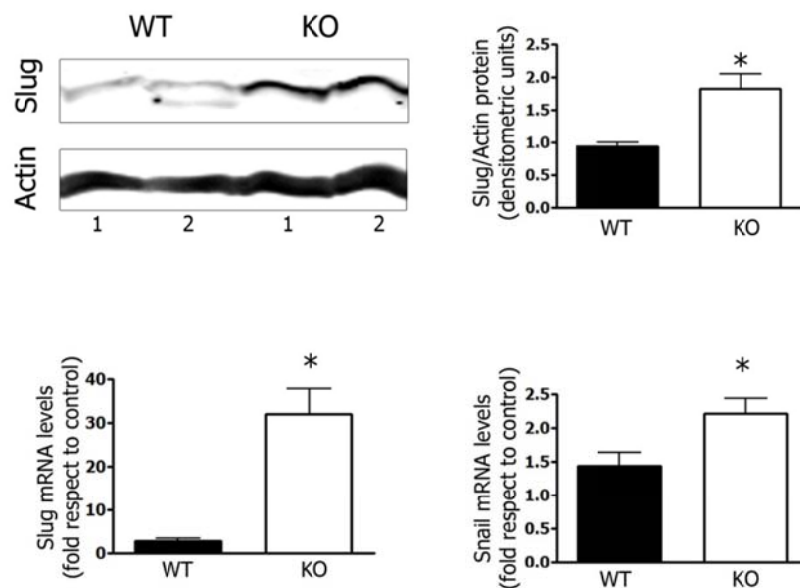
La actividad de la ruta de Notch fue estudiada en las MLEC aisladas a partir de ratones KO para Dlk1. Como se muestra en la figura 42, observamos mayores niveles de las proteínas NICD (B) y Hey-1, en los animales KO tanto a nivel de proteína como de mRNA (C). Esto indica que en este modelo de células endoteliales carentes de Dlk1 en condiciones basales hay una mayor actividad de la ruta de Notch. (Fig. 43).



**Figura 41. Niveles de proteínas implicadas en la ruta de Notch en células MLEC WT y KO para Dlk1.** Niveles de proteína de Dlk1 en MLEC WT y KO para Dlk1 (A). Niveles de proteína de NICD en células MLEC WT y KO. El gráfico muestra la cuantificación por densitometría de la proteína de NICD (B). Niveles de proteína de Hey 1 en células MLEC WT y KO, donde el gráfico muestra la cuantificación por densitometría de la proteína Hey1 y niveles de mRNA determinados por PCR en tiempo real (C).

Para estudiar los niveles de las proteínas Slug y Snail1, implicadas en la ruta de Notch y en la TEM en células endoteliales KO para Dlk1 se aislaron proteína y mRNA de las mismas a partir de cultivos celulares.

Las células KO para Dlk1 presentaron mayores niveles de Slug y Snail1 tanto en mensajero como en proteína (**Fig 44**).



**Figura 42. Regulación de Snail y Slug en células MLEC WT y KO para Dlk1.** Se determinaron los niveles de proteína Slug en células MLEC WT y KO. El gráfico muestra la cuantificación por densitometría de la proteína Slug (A). Se determinaron los niveles de mRNA de Slug y Snail en células MLEC WT y KO, donde el gráfico muestra la cuantificación por PCR en tiempo real (B).

#### 5.3.4. El efecto de DLK1 tiene lugar antes de la proteólisis del receptor de Notch.

El efecto antagónico de DLK1 sobre la ruta de Notch podría tener lugar mediante competencia con los ligandos canónicos. Sin embargo, también se ha descrito la interacción directa con el sistema del doble híbrido [112, 184].

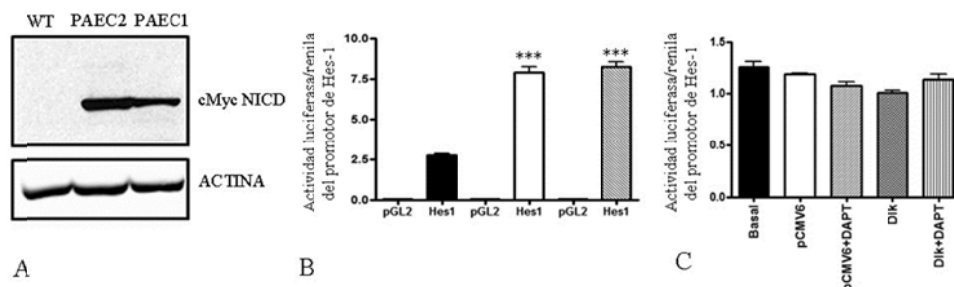
Para ver averiguar si Dlk1 actúa antes o después de la interacción con el receptor de Notch se utilizó la línea celular endotelial de aorta porcina (PAEC)



## Resultados

que expresa la forma activa del receptor de Notch NICD de manera constitutiva y estable.

Como se muestra en la figura 45, en las células que sobreexpresan NICD se detectó una actividad basal del promotor de Hes-1 significativamente mayor que en las células control (panel **B**). La sobreexpresión de Dlk1 en las células donde NICD está expresado de manera estable, no tuvo efecto sobre la actividad del promotor de Hes-1 (**C**).

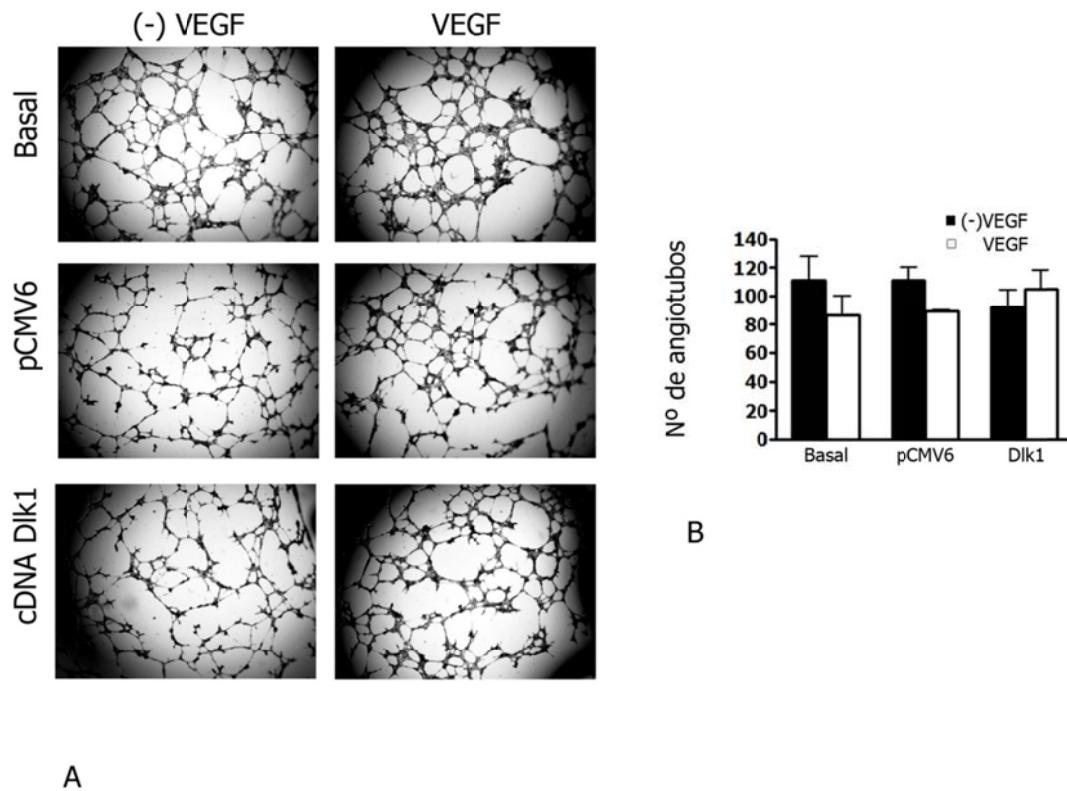


**Figura 43. Efecto de Dlk1 sobre la actividad del promotor de Hes-1 en células endoteliales que sobreexpresan NICD.** Niveles de NICD en línea estable de células endoteliales de aorta porcina (PAEC WT) controles y que sobreexpresan NICD (PAEC 1 y 2)(A). Actividad luciferasa del promotor de Hes1 células PAEC control y que sobreexpresan NICD (B), y en células transfectadas con Dlk1 y tratadas con el inhibidor de la ruta de Notch DAPT (C).

### 5.3.5. La sobreexpresión de NICD bloquea el efecto de Dlk1 sobre la angiogénesis en matrigel.

Una vez demostrado que en células que expresan de forma estable el NICD, la actividad de la ruta de Notch no se ve afectada por Dlk1, se procedió a estudiar si la capacidad de formar angiotubos en estas células se alteraba o no.

La sobreexpresión de Dlk1 no afectó a la formación de angiotubos en matrigel. De nuevo la presencia de VEGF no tuvo efecto significativo sobre la formación de los angiotubos en las células donde se sobreexpresaba Dlk1 (**Fig. 46**).



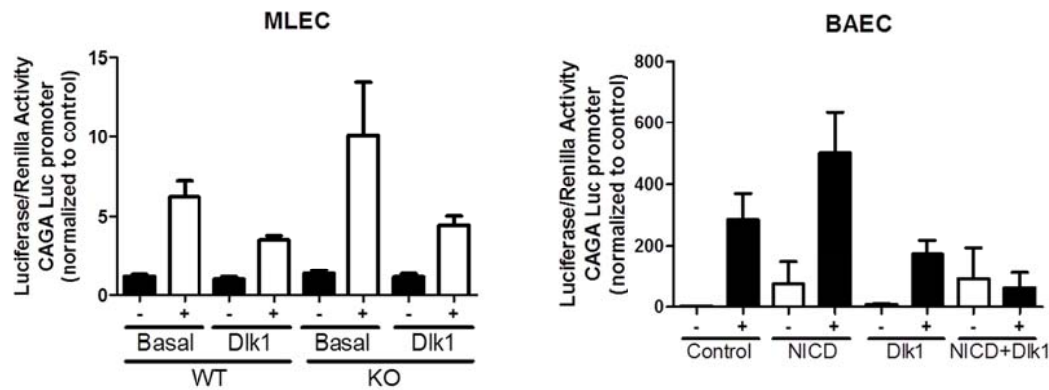
**Figura 44. Formación de angiotubos de células endoteliales de aorta porcina (PAEC) que sobreexpresan NICD sembradas sobre matrigel.** Formación de angiotubos a las 4 horas de cultivo de PAEC sembradas sobre matrigel (A). Cuantificación del número de angiotubos tanto en presencia como en ausencia de VEGF (B).

## 5.4 Interacción de Dlk1 con la ruta de TGF- $\beta$ .

### 5.4.1 Activación por TGF- $\beta$ en células endoteliales MLEC WT y KO para Dlk1.

Dada la conocida interacción entre las ruta de Notch y TGF  $\beta$ , se planteó la hipótesis de que Dlk1 pudiera modular esta interacción, existiendo ya algún precedente ya que se ha descrito que Dlk1 es capaz de promover neurogénesis regulando la vía de Notch y la vía BMP [185].





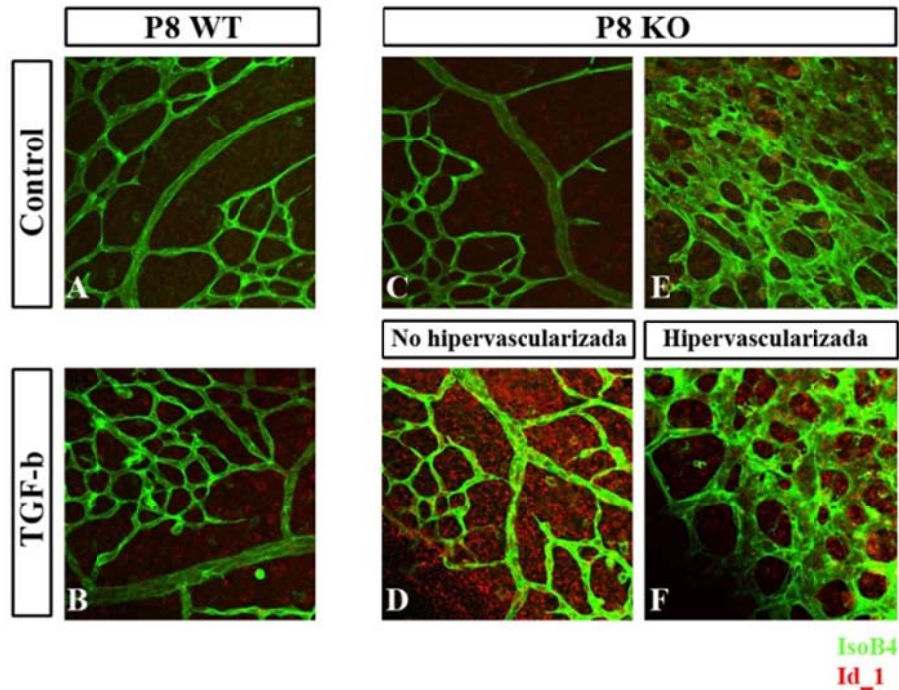
**Figura 45. Activación de la ruta de TGF- $\beta$  en células WT y KO para Dlk1.** Actividad luciferasa del promotor CAGA-Luc en respuesta a TGF- $\beta$  en células MLEC de ratones WT y KO para Dlk1 en condiciones basales y sobreexpresando Dlk1 (A). Actividad luciferasa del promotor CAGA-Luc en respuesta a TGF- $\beta$  en células BAEC con la ruta de Notch activada (NICD) y sobreexpresando Dlk1 (B).

Para comprobar si DLK1 tiene algún efecto sobre la ruta de TGF  $\beta$ , y en particular sobre el proceso de angiogénesis se estudió la respuesta a TGF  $\beta$  mediante un reportador de luciferasa que contiene una región del promotor de PAI-1 (CAGA-Luc), una de las dianas mejor conocidas de la ruta de TGF  $\beta$ . La respuesta fue significativamente mayor en las células provenientes de ratones KO para Dlk1. La sobreexpresión o re-expresión de Dlk1 revirtió parcialmente este efecto, siendo la respuesta menor (**Fig 46**).

#### 5.4.2. Papel de TGF- $\beta$ en la regulación de la angiogénesis retiniana de ratones WT y KO para Dlk1.

Para comprobar si el efecto de Dlk1 sobre la ruta de TGF- $\beta$  tiene lugar también in vivo, se procedió a estudiar el estado de activación de la ruta de TGF- $\beta$  en retinas de ratones KO para Dlk1 y WT. Para ello se utilizó la proteína Id-1 que es útil para monitorizar la respuesta a TGF- $\beta$ . Como se observa en la

figura 44, los niveles de Id-1 son mayores en las retinas de los animales KO comparadas con los WT. Este aumento basal del estado de activación se observa tanto en las zonas de vasculatura normal como en regiones donde selectivamente se detecta hipervascularización.



**Figura 46.** Imágenes representativas de retinas de ratones WT y KO para Dlk1. Detalle de retinas de ratones a día 8 postnatal WT control (A) y tratados con TGF- $\beta$  (50 ng/ml) durante 3 horas (B). Detalle de retinas de ratones KO a día 8 postnatal no tratados (C) y tratados con TGF- $\beta$  (D) en zonas no hipervascularizadas y no tratados (E) y tratados con TGF- $\beta$  (F) en zonas hipervascularizadas.







## 6. DISCUSIÓN

La proteína DLK1 se ha descrito como un ligando no canónico de la ruta de Notch que aunque carece del dominio DSL necesario para el reconocimiento y posterior unión al receptor de Notch es capaz de unirse y producir una inhibición de la ruta. Ya que la ruta de Notch se encuentra muy implicada en el proceso de la angiogénesis se quiso ver si DLK1 puede tener algún efecto sobre este proceso, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas.

Primero se comprobó si DLK1 se expresa en las células endoteliales adultas. Hasta el momento no se había descrito nada al respecto, únicamente se había detectado a nivel embrionario, donde se había observado que los niveles de esta proteína son muy altos y su expresión disminuye en el organismo adulto quedando restringida únicamente a determinados órganos y células, como son: glándula pituitaria, glándula adrenal y células  $\beta$  del páncreas. Una vez comprobado que DLK1 se expresa en células endoteliales de organismos adultos de diferentes especies, estudiamos si las variaciones en los niveles de esta proteína podrían influenciar al proceso de la angiogénesis. Para ello hicimos varias aproximaciones tanto in vitro, como la formación de angiotubos en matrigel; ex vivo, como los ensayos de anillos de aorta y estudios de la formación de la vasculatura in vivo, como la implantación de plugs de matrigel y estudios de la formación de vasos en la retina de ratones y en el modelo del pez zebra. Comprobamos como variaciones en los niveles de DLK1 alteran el desarrollo de la vasculatura, no solamente en condiciones fisiológicas sino también en condiciones fisiopatológicas, como es la formación de vasos asociada a tumores en el modelo de pez zebra.

También se estudió a través de que ruta DLK1 podría estar alterando el proceso de angiogénesis. La primera ruta que decidimos estudiar es la ruta de Notch, y encontramos como variaciones en los niveles de DLK1 producen variaciones en la activación de la ruta de Notch. Las variaciones que encontramos en la formación de vasos mediadas por alteraciones en los niveles de DLK1 no se explican totalmente por variaciones de la ruta de Notch. Esto nos llevó a estudiar otras posibles rutas implicadas en el proceso de

angiogénesis, como son principalmente las rutas de señalización del VEGF y del TGF- $\beta$ . En la ruta del VEGF no se observó que la alteración en los niveles de DLK1 tuviesen un efecto en la activación de esta ruta. Respecto a la ruta del TGF- $\beta$ , si parece haber algún efecto sobre la activación de esta ruta cuando variamos los niveles de DLK1.

El proceso de angiogénesis es un proceso complejo regulado por varias rutas, que a su vez son también rutas complejas, por lo que replanteó un estudio en mayor profundidad, tanto en la ruta Notch, estudiando posibles interacciones de los ligandos canónicos de dicha ruta con el ligando no canónico DLK1 como en la ruta de TGF- $\beta$ .

### **6.1. DLK1 se expresa en células endoteliales de organismos adultos.**

Uno de los tipos celulares donde se describió originalmente la proteína DLK1 es el preadipocito [92, 130, 141, 186], donde está implicada en su diferenciación hacia el adipocito. También se describió inicialmente en carcinoma de pulmón y en una línea celular tumoral neuroendocrina [180]. Posteriormente se describió en otros tipos celulares como células  $\beta$  del páncreas, en células somatotropas de la glándula pituitaria y en células madre mesenquimales de médula ósea (hMCS). Las hMCS tienen la capacidad de diferenciarse hacia varios tipos celulares, como adipocitos, osteocitos, condrocitos, cardiomiocitos, mioblastos, neuronas y astrocitos. En todos estos tipos celulares DLK1 tiene una función muy importante ya que participa en su proceso de diferenciación. Es necesario que haya una regulación de los niveles de esta proteína. Así, la sobreexpresión de Dlk1 inhibe la diferenciación de los adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Esto apunta a que la expresión de esta proteína podría estar implicada en mantener un estado no diferenciado en varios tipos celulares.

En general los niveles de DLK1 son elevados durante el período embrionario, mientras que en el adulto su expresión llega prácticamente a desaparecer de forma que queda restringida únicamente a determinados tejidos como páncreas, médula ósea, glándula pituitaria y glándula adrenal [10-12]. También se ha detectado su expresión en los vasos de la placenta [97,

187], y en tejido tumoral como carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón, neuroblastoma y tumores endocrinos [151]. Uno de los primeros hallazgos de este trabajo ha sido la detección de Dlk1 en células endoteliales de organismos adultos en diferentes especies: humana, bovina, porcina y murina. Se ha detectado tanto el mRNA de Dlk1 como la expresión de la proteína.

Esta nueva localización en células endoteliales adultas sugiere que podría desempeñar una nueva función en otro contexto diferente a los previamente descritos.

## **6.2. La ausencia de DLK1 está asociada con un aumento en la angiogénesis.**

Una vez comprobada la expresión de DLK1 en las células endoteliales de organismos adultos y que esta proteína tiene una estructura muy similar a los ligandos canónicos de la ruta de Notch, se estudió si esta proteína puede desempeñar algún papel en el contexto de la angiogénesis. Al estudiar la posible implicación de la proteína DLK1 en el proceso de formación de vasos utilizando varios modelos experimentales se observó cómo esta proteína tiene efectos considerables sobre la formación de la vasculatura. Hasta ahora la implicación de Dlk1 en el proceso de angiogénesis se ha descrito únicamente a nivel embrionario, donde se ha detectado su expresión en sitios de “branching” en morfogénesis y en los vasos sanguíneos de la placenta [97]. Por ello la implicación de Dlk1 en el proceso de angiogénesis en organismos adultos era un proceso desconocido hasta la realización de este trabajo.

En el estudio de la angiogénesis utilizando modelos in vivo, se observó como en las retinas de los ratones deficitarios en Dlk1, existe un engrosamiento en zonas de la vasculatura y un aumento en el número de células “tip” y filopodios en regiones aisladas de la retina, siguiendo una distribución al azar. Se utilizó además otro modelo in vivo para confirmar los resultados, el pez zebra, en el cual al eliminar la copia de Dlk1 mediante un antagonista génico (morfolino), se produce un aumento en la formación de los vasos subintestinales.



Estos resultados obtenidos en modelos animales están apoyados por otros modelos experimentales. Así, en un modelo ex vivo en el que se extraen aortas de los animales KO para Dlk1 y los animales control y se hacen anillos que se embeben en matrices, las células endoteliales provenientes de los anillos de los ratones KO para Dlk1 tienen mayor capacidad de migración y formación de angiotubos comparada con los animales control que expresan la proteína. Además cuando se realizan otros experimentos para ver la capacidad angiogénica de estas células endoteliales carentes de Dlk1 obtenidas a partir de pulmones de los animales KO, se observa como estas células tienen una mayor capacidad de formación de angiotubos sembradas sobre una matriz de matrigel comparada con las células controles.

El proceso de proliferación y el de migración están implicados en la angiogénesis, donde se encuentran ambos aumentados tanto en procesos fisiológicos como en procesos fisiopatológicos. Esta hiperangiogénesis que observamos en ausencia de DLK1 se vio también acompañada de un aumento en la proliferación y migración de las células endoteliales carentes de DLK1 comparadas con las células endoteliales controles, reflejado en mediciones de XTT y ensayo de cierre de heridas en placa. Para descartar un efecto por muerte celular se estudió el proceso de apoptosis, no encontrándose ninguna diferencia entre las células endoteliales carentes de DLK1 y las células control. Estos datos apoyan que la proteína DLK1 en las células endoteliales está implicada en el proceso de proliferación celular. Este efecto de DLK1 sobre la proliferación se ha descrito también en otros tipos celulares, como preadipocitos y células hematopoyéticas, donde la expresión de Dlk1 inhibe no solamente el proceso de diferenciación sino también la proliferación mediante regulación de la entrada de la célula en fase G1/S [188, 189]. Sin embargo, en experimentos de reparación de herida realizados in vivo en tejido de la oreja sobre ratones de las cepas MRL y C57BL/6 se observa una reparación completa del tejido en el ratón de la cepa MRL, que expresa mayores niveles de DLK1, localizados principalmente en el blastema, donde se encuentran las células no diferenciadas que están proliferando activamente [148]. Estas diferencias entre los resultados descritos en la bibliografía in vivo y nuestros datos in vitro de cierre de herida en placa con células endoteliales podrían

deberse fundamentalmente al modelo utilizado para realizar el ensayo, donde al partir de un modelo in vivo existen muchos más factores que afectan al proceso de cierre de la herida y que no podemos controlar, mientras que en nuestro ensayo in vitro el número de variables que pueden influir en el proceso disminuye considerablemente. Además, en el modelo descrito in vivo los niveles mayores de DLK1 se localizan en el blastema y no se menciona nada acerca de los niveles de la proteína en el endotelio, objeto específico de nuestro modelo in vitro.

En consistencia con los resultados anteriores, al aumentar los niveles de la proteína DLK1, en el modelo in vivo de embriones pez zebra inyectados con el cDNA de Dlk1, se observa un patrón anormal de vascularización con una formación aberrante de los vasos intersegmentales y ausencia de anastomosis de la arteria dorsal intersegmental. Utilizando otro modelo in vivo de ratón, se constató que la proteína DLK1 inhibe la formación de vasos en una matriz de matrigel implantada subcutáneamente con factor de crecimiento VEGF. Además en el modelo ex vivo de anillos de aorta, el aumento de angiogénesis que se observa en los animales KO para Dlk1 se revierte al re-expresar la proteína mediante un vector adenoviral de forma dependiente de la concentración.

En conjunto todos estos resultados apoyan que los cambios en la expresión de la proteína DLK1, dan lugar a alteraciones en la formación de vasos en el contexto fisiológico, ya sea hiperangiogénesis por ausencia de la proteína o inhibición del proceso por sobreexpresión de la proteína.

### **6.3. DLK1 regula el desarrollo vascular en angiogénesis tumoral en pez zebra.**

Tras comprobar el efecto de DLK1 en el proceso de angiogénesis en condiciones fisiológicas se estudió si además tiene una función en la angiogénesis tumoral. La angiogénesis fisiológica se asocia a los procesos de iniciación, formación, maduración, remodelado y regresión de células endoteliales, todos altamente regulados. Sin embargo se admite que durante la formación de un tumor, esta regulación está alterada, con supresión de

remodelado y regresión vasculares. Para estudiar este fenómeno en el modelo in vivo del pez zebra se inyectaron células tumorales de mamífero proangiogénicas en el espacio perivitelino [190]. En las condiciones normales control hay un crecimiento de vasos hacia la masa de células tumorales. Cuando se bloquea la expresión de DLK1 mediante un morfolino se observa un mayor crecimiento de vasos hacia la masa de células tumorales. Se consiguió revertir el efecto de bloquear la expresión de DLK1 sobre la formación de vasos, y se recuperó el fenotipo de los controles al coinyectar el mRNA de Dlk1. Nuestros datos sugieren por tanto que el papel de Dlk1 en la formación de los vasos también se refleja en procesos patológicos, como es la angiogénesis tumoral, donde actúa como inhibidor.

La implicación de Dlk1 en angiogénesis tumoral se ha descrito posteriormente en la literatura en un modelo de ratón que es transplantado subcutáneamente con células tumorales RENCA, donde el tratamiento con vacunas basadas en péptidos o sobreexpresión de Dlk1 mediante lentivirus son ambos inmunogénicos y capaces de activar la respuesta inmune por parte de los linfocitos citotóxicos. Esta respuesta inmune va dirigida contra las células que expresan mayoritariamente DLK1 en esa zona tumoral y estas células son los pericitos que recubren los vasos nuevos que se forman en la masa tumoral. De esta forma tanto los péptidos de Dlk1 como la sobreexpresión mediante lentivirus son terapéuticos contra el tumor [191], de forma que se produce una normalización de los vasos sanguíneos asociados al tumor. Esta normalización de los vasos asociados al tumor tiene su reflejo en varios parámetros como son: disminución del número de vasos sanguíneos, cambios en la distribución de la vasculatura, disminución de la hipoxia que se produce principalmente en el centro de la masa tumoral y disminución de la permeabilidad vascular.

#### 6.4. DLK1 inhibe la angiogénesis por antagonismo con la ruta de Notch.

Para estudiar el mecanismo por el cual DLK1 modula el proceso de angiogénesis se evaluó el estado de activación de la ruta de señalización de Notch en las células endoteliales provenientes de pulmón de los animales carentes de DLK1 y de los animales control. En las células endoteliales carentes de DLK1 hay mayores niveles del receptor de Notch activado, NICD. Estos mayores niveles de NICD se han visto anteriormente en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) derivados de ratones KO para *Dlk1* [192]. Además hay mayores niveles de algunas dianas finales de la ruta como HES-1, HEY, SLUG y SNAIL, lo que sugiere que la ruta de Notch está basalmente activada cuando no existe DLK1 (Fig. 42). Además, en nuestro modelo in vitro, la proteína DLK1 es capaz de antagonizar la ruta de Notch, utilizando como ensayo la actividad luciferasa del promotor de Hes-1 (Fig. 40). En el modelo del pez zebra se observa el mismo efecto sobre la ruta de Notch. La reducción de los niveles de DLK1 mediante un morfolino promueve la activación de la ruta de Notch, reflejada en un ensayo reportador (Fig. 41). Por el contrario, la sobre-expresión de DLK1 mediante el mRNA, produce el efecto opuesto.

En trabajos anteriores se ha descrito como DLK1 es capaz de interaccionar con el receptor de NOTCH1 [184, 192, 193]; es posible que DLK1 se una a las repeticiones EGF10-11 o EGF12-13 del receptor de NOTCH, lo que bloquearía la unión y activación de la ruta de Notch por el ligando canónico. Este se une habitualmente al receptor en trans a través de las repeticiones EGF11-12, por lo que DLK1 actuaría potencialmente como un antagonista. Sin embargo, aún no se ha demostrado la unión directa de DLK1 y el receptor ya sean endógenos o expresados ectópicamente. Se ha descrito que los niveles altos de DLK1 se asocian con la disminución en algunos genes diana de la ruta de Notch, como Hes-1 y E(spl) [184]  $m\beta$  en mamíferos y mosca respectivamente [182-184]. También se ha descrito el efecto opuesto, de manera que el dímero de DLK1 aumenta la expresión de Hes-1 en timocitos [117]. Otros autores han propuesto modos alternativos de acción de DLK1, mediante una interacción directa con fibronectina [138] y otras moléculas, como IGFBP1 [194], aunque estas interacciones no implican la región de EGF de DLK1.

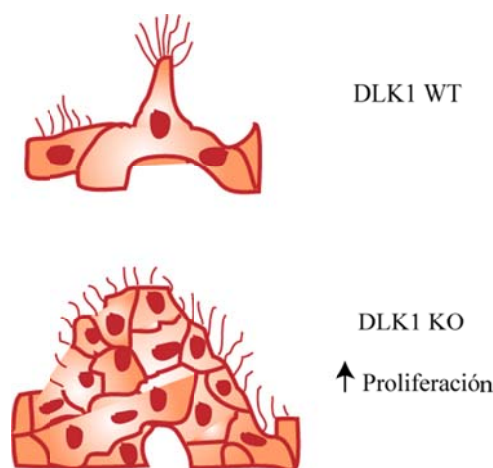
A la vista de los resultados, el efecto de DLK1 sobre el proceso de angiogénesis, ya sea fisiológico o patológico, parece estar mediado a través de la ruta de Notch. De acuerdo con esta propuesta Dlk1 podría actuar como competidor por el receptor de Notch en el endotelio con los ligandos canónicos que hay ya descritos, y que tienen diferente efecto sobre el proceso de angiogénesis.

### Mecanismos potenciales del efecto de DLK1 sobre angiogénesis

La ruta de señalización de Notch es fundamental en el proceso de angiogénesis. La regulación de la ruta de Notch se produce a diferentes niveles. Una primera forma de regulación es por la interacción del receptor con los ligandos canónicos. Esta interacción es también dependiente de contexto, de forma que según al ligando que se una y el entorno puede dar lugar a diferencias en la activación o inhibición de la ruta de señalización. Una segunda regulación se produce por las modificaciones post-traduccionales del receptor, ya sean glicosilaciones o acetilaciones, que hacen que el receptor tenga mayor afinidad por unos ligandos u otros, dando lugar también como consecuencia a inhibición o activación de la ruta. Así los ligandos canónicos de la ruta de Notch, Dll4 y Jagged1 tienen efectos opuestos en el proceso de angiogénesis mediado por VEGF, de forma que controlan el equilibrio entre célula “tip” y célula “stalk”. Esto se hace por la modificación post-traducciona por Fringe, la glicosiltransferasa que modifica el receptor favoreciendo así la interacción con un ligando frente a otro [176]. Además puede darse una regulación de la ruta de Notch por internalización del receptor, lo que puede dar lugar tanto a una activación como a una inhibición. Esta internalización se produce mediante invaginaciones que dan lugar a endosomas primeramente tempranos y después tardíos, en los que se puede producir la proteólisis del receptor, dando lugar a la isoforma activa NICD; o pasar a degradación vía proteosoma por modificación con ubiquitina. Se ha descrito como el bloqueo de esta ruta de señalización da lugar a defectos en el remodelado vascular en el saco embrionario y a una formación aberrante del circuito arteria-vena en los embriones de ratón [195]. De los componentes de la ruta, dos de los cinco receptores de Notch, que son los receptores Notch1 y Notch4 y tres de los cinco ligandos canónicos de Notch, que son Jagged1, Dll1 y Dll4 se expresan

en las células endoteliales y participan en la formación de la vasculatura. Hay muchos estudios previos en los que se demuestra como alteraciones de la ruta de Notch dan lugar a una formación anormal de los vasos sanguíneos [195, 196] asociándose tanto a mutaciones en los receptores Notch1 y Notch4, como en los ligandos canónicos Jagged1, Dll1 y Dll4. En particular el ligando Dll4 está muy implicado en la regulación de la diferenciación hacia célula emergente o “tip” y célula soporte o “stalk”. Se ha descrito como deleciones en heterocigosis de Dll4 en ratón o la inhibición farmacológica de la ruta de Notch están asociadas con un incremento en el número de células tip endoteliales que emiten filopodios y un aumento en la expresión de genes marcadores de estas células “tip” comparado con los controles, lo que sugiere que Dll4 es un regulador negativo del “sprouting” vascular [197]. Se acepta en el momento actual que la proteína DLK1 se comporta como un ligando no canónico de la ruta de Notch, por su homología estructural con los ligandos canónicos [35]. DLK1 puede interaccionar con el receptor de NOTCH1 a través de la repeticiones EGF [184] con lo que podría actuar como antagonista de la ruta de Notch.

Por los resultados obtenidos en el modelo de ratón carente de Dlk1, no habría un bloqueo de la ruta de Notch, sino una sobreactivación. Según el modelo descrito esto llevaría a una disminución en el número de células “tip” o emergentes y un aumento del número de células “stalk” o soporte. Este mayor número de células stalk podría explicar las zonas de mayor engrosamiento que se encuentran en zonas localizadas de la retina, pero en nuestro modelo también vemos un aumento del número de células “tip” que emiten filopodios en el frente angiogénico. El fenotipo que encontramos en las retinas de los animales KO para Dlk1 es similar al fenotipo descrito para los animales que no expresan el ligando canónico de la ruta de Notch Jagged1, que es un regulador pro-angiogénico que actúa inhibiendo la activación de la ruta de Notch por Dll4 [176]. Es posible que DLK1 puede desempeñar una función similar al ligando canónico Jagged1 inhibiendo la activación de la ruta de Notch por Dll4.



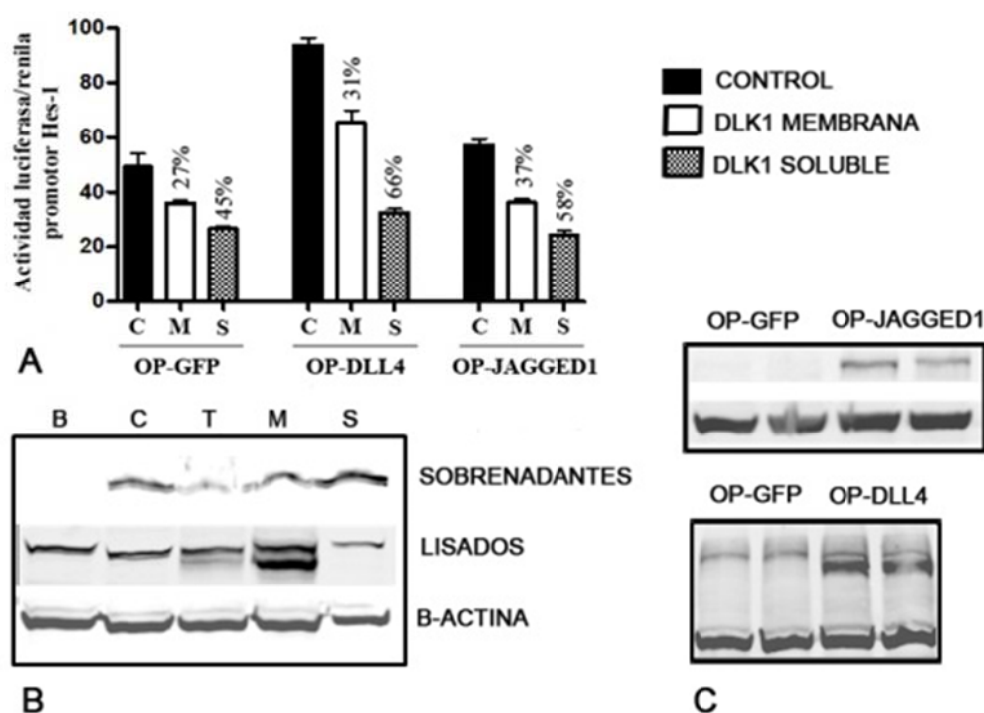
**Figura 47. Fenotipo de las retinas de ratones KO para Dlk1.** Mayor engrosamiento en zonas localizadas de la vasculatura.

Aun así la interacción entre ligandos canónicos y no canónicos de Notch es algo compleja [198] y se necesitarían hacer mayores estudios, para establecer el papel concreto de Dlk1 y que ligandos canónicos de Notch quedan potencialmente afectados en el proceso de vascularización.

Para estudiar si existe competición entre los ligandos canónicos de la ruta de Notch expresados principalmente en células endoteliales Dll4 y Jagged1 y el ligando no canónico de la ruta de Notch DLK1, hicimos una primera aproximación utilizando un co-cultivo de células estromales que sobreexpresan los ligandos canónicos Dll4 o Jagged1 y células endoteliales que sobreexpresan o no diferentes isoformas de DLK1. En esta primera observación se observó que DLK1 tanto soluble como anclado a membrana es capaz de reproducir la inhibición de la ruta de Notch co-cultivando las células endoteliales con las células estromales control que expresan la proteína verde fluorescente (GFP). Este resultado es similar al que habíamos visto anteriormente mediante actividad luciferasa del promotor de Hes-1 en células BAEC. Cuando co-cultivamos las células endoteliales con células estromales que sobreexpresan DLL4-GFP, vemos un aumento de la actividad luciferasa del promotor de Hes-1, lo que nos indica una activación de la ruta de Notch. Al co-cultivar las células endoteliales con células estromales que sobreexpresan JAGGED1, observamos también un aumento de la ruta de Notch, pero en este



caso el aumento es menor. En ambos co-cultivos al sobreexpresar en las células endoteliales las isoformas de DLK1, ambas son capaces de inhibir la ruta de Notch, aunque en nuestro modelo vemos una mayor inhibición mediada por la isoforma soluble (Fig. 49.)



**Figura 48. Co-cultivo de células OP estromales y células BAEC. Inhibición de la actividad de la ruta de Notch medida mediante actividad luciferasa del promotor de Hes-1.** Tanto la isoforma de DLK1 anclada a membrana como soluble inhiben la ruta de Notch en condiciones basales y activada por los ligandos canónicos DLL4 y JAGGED1 sobreexpresados en las células estromales OP (A). Sobreexpresión en células endoteliales de las diferentes isoformas de DLK1 (B:basal, C:control, T:DLK1 total, M:DLK1 anclado a membrana, S:DLK1 soluble) (B). Sobreexpresión de los ligandos canónicos Dll4 y Jagged1 en las células estromales OP (C).

Esta inhibición de la ruta de Notch se ha descrito en otro modelo de célula Balb/c14, que son un subclon de las células 3T3-L1 que expresan Notch1 y no expresan Dlk1. Al añadir DLK1 se inhibe la ruta de Notch en las células donde se ha activado la ruta mediante sobreexpresión de Jagged1 por un plásmido ó inmovilización en placa de Dll4 [192].

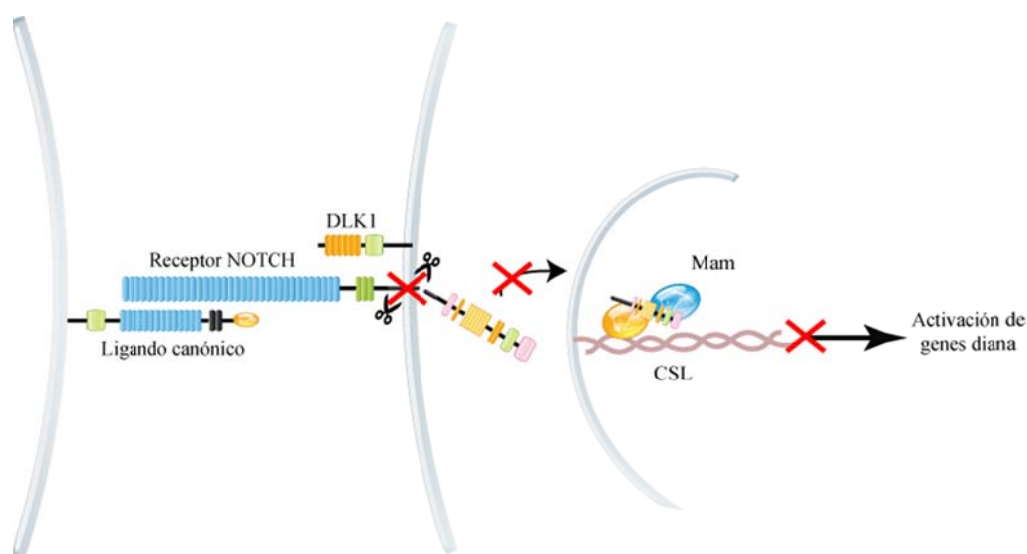


Según nuestros resultados, DLK1, tanto la forma soluble como anclada a membrana, son capaces de inhibir la ruta de Notch activada por DLL4 o JAGGED1 en nuestro modelo de células endoteliales, de forma que actúan como antagonistas de la ruta de Notch. La posible competición entre los ligandos canónicos y el ligando no canónico DLK1 podría producirse por impedimento de la unión de los ligandos canónicos al receptor a través de las repeticiones EGF 11-12, de forma que quedarían bloqueadas estas posiciones, ya que DLK1 se ha descrito que se une al receptor a través de las repeticiones 10-11 y 12-13.

### **6.5. DLK1 inhibe la ruta de Notch en un paso inicial de la señalización.**

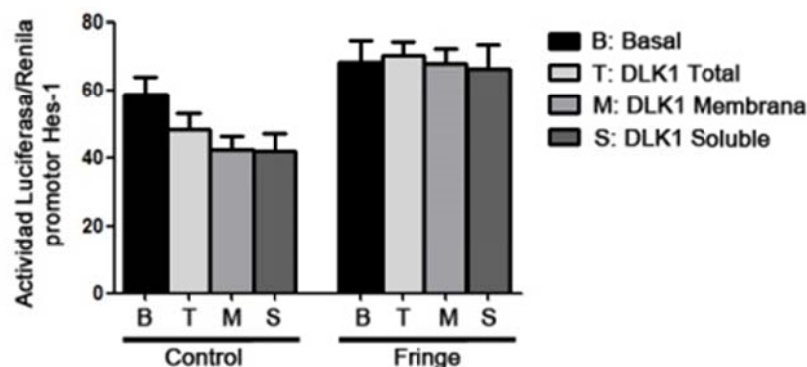
Hemos intentado abordar el estudio sobre el nivel de la ruta de Notch interferido por DLK1. Comprobamos como la proteína DLK1 está ejerciendo su efecto de inhibición a nivel de membrana, cuando el receptor no se ha unido al ligando y no se encuentra proteolizado en su forma activa, ya que células endoteliales que sobreexpresan la forma activa del receptor NICD siguen formando angiotubos sembradas sobre una matriz de matrigel en presencia de DLK1. Se observó como DLK1 es incapaz de inhibir la ruta de señalización de Notch una vez que el receptor se encuentra en su forma activa, como pudimos comprobar utilizando un modelo celular que sobreexpresa la forma activa del receptor de NOTCH (NICD). En este modelo donde tenemos la ruta de Notch sobreactivada, DLK1 es incapaz de disminuir la actividad del promotor de Hes-1. Se comprobó además mediante ensayos funcionales in vitro, donde la sobreexpresión de Dlk1 en células endoteliales que sobreexpresan la isoforma activa del receptor de Notch (NICD), no produce la inhibición de formación de angiotubos que se da en condiciones normales.

Por ello podemos concluir que el efecto de DLK1 sobre la inhibición de la angiogénesis mediante la inhibición de la ruta de Notch se produce a nivel del receptor, donde podría haber una competencia directa con los ligandos canónicos de la ruta de Notch; de forma que una vez que la ruta está activada DLK1 no tiene efecto sobre la misma.



**Figura 49. Modelo de inhibición de la ruta de Notch por DLK1.** La proteína DLK1 tanto en la isoforma soluble como en la anclada a membrana inhibe la activación de la ruta de Notch a nivel membrana, antes de producirse la proteólisis del receptor para generar la forma activa del receptor NICD.

Una de las formas de regulación de la ruta de Notch es a nivel de modificación post-traducciona del receptor por glicosilación. Según el modelo in vivo descrito en retina cuando el receptor está modificado interacciona principalmente con el ligando canónico Dll44, dando lugar a una activación de la ruta, mientras que cuando no está modificado interacciona con Jagged1 inhibiéndose la ruta [176]. Para estudiar si esta modificación post-traducciona por glicosilación del receptor de Notch puede afectar a la unión de DLK1 realizamos una primera aproximación favoreciendo la glicosilación del receptor mediante la sobreexpresión de la glicosiltransferasa Fringe mediante un plásmido, y miramos el nivel de activación de la ruta de Notch por la actividad luciferasa del promotor de Hes-1. Lo que observamos fue que cuando el receptor se encuentra más glicosilado DLK1 no es capaz de inhibir la ruta de Notch (**Fig. 52**)



**Figura 50. Actividad de la ruta de Notch por Hes-1 con modificación post-traducciona por Fringe.** Ninguna de las isoformas de DLK1 (T: total, M: de membrana, S: soluble) son capaces de inhibir la ruta de Notch medida por actividad luciferasa del promotor de Hes-1 cuando se produce modificación post-traducciona por Fringe ( media  $\pm$  SEM, n=3).

#### 6.6. Dlk1 interfiere con la activación de la ruta de TGF- $\beta$

Además de la ruta de Notch, no puede descartarse que otras rutas importantes en la angiogénesis como la de TGF- $\beta$  también esté implicada [199]. Esta ruta está interconectada con la ruta de Notch, ya que ambas cooperan en la expresión de algunos genes que son diana final, como Hes-1 ó Id-1.

Al estudiar la implicación de esta ruta en células endoteliales mediante un elemento de unión de Smad3/Smad4 (denominado CAGA) unido al reportero de luciferasa, observamos como la ausencia de DLK1 en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC KO) es capaz de producir una mayor activación de esta ruta de señalización en respuesta a TGF- $\beta$  comparado con las células control WT. Por el contrario una sobreexpresión de DLK1 es capaz de disminuir la respuesta a TGF- $\beta$ . El comportamiento de las células endoteliales de aorta bovina (BAEC) puede considerarse análogo ya que la sobreexpresión de NICD, se asocia con mayor actividad luciferasa del reportero CAGA Luc, que sin embargo disminuye cuando se sobreexpresa DLK1.

También en el modelo in vivo de retina de ratón, hay una mayor activación de esta ruta en respuesta a TGF- $\beta$  en los animales sin DLK1, que se ve reflejada en el aumento de uno de los genes diana, Id\_1. Esta proteína interactúa directamente con el dominio HLH de Hes\_1 suprimiendo la unión de Hes\_1 en su propio promotor, de forma que se interrumpe su autorepresión, por lo que los niveles de HES-1 son mayores. Ello había sido observado anteriormente en las células endoteliales que provienen de los animales KO para Dlk1 comparadas con los controles. Esto no interfiere con la actividad supresora de Hes\_1 sobre otros genes diana que tienen sitios de unión a Hes\_1 [200], como por ejemplo Dll1 y Dll4 en cuyas regiones promotoras se une Hes-1 y regula negativamente su expresión en “stem cells” [201, 202]. Estos datos sugieren que la ausencia de DLK1 favorece una mayor respuesta a TGF- $\beta$ .

Según los resultados obtenidos en este trabajo la proteína DLK1 está implicada en la formación de la vasculatura tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Esta nueva función para DLK1 en el contexto de la angiogénesis amplía las opciones para el tratamiento de patologías asociadas a anomalías en la formación de vasos, como por ejemplo para el tratamiento del cáncer, donde el proceso de angiogénesis se ha reconocido como diana terapéutica. El primer agente antiangiogénico que comenzó utilizándose y sigue utilizándose en la actualidad es el anticuerpo dirigido contra el VEGF (Bevacizumab), que se ha utilizado tanto en cáncer como en neovascularización ocular. Pero estos tratamientos no son totalmente eficaces y en algunos casos se acaba desarrollando resistencia. Por ello es importante encontrar nuevos mecanismos dirigidos principalmente al bloqueo de la formación de la red vascular que alimenta la masa tumoral. Todas aquellas rutas de señalización implicadas en el desarrollo de la angiogénesis serían potencialmente dianas, por lo que la ruta de Notch y TGF- $\beta$  pueden ser candidatas para el desarrollo de nuevas terapias antiangiogénicas. Así DLK1 puede representar nueva herramienta para la regulación del proceso de la angiogénesis mediante efectos sobre la ruta de Notch y de TGF- $\beta$ .



## ***CONCLUSIONES***



## 7. CONCLUSIONES.

1. DLK1 se expresa en células endoteliales, donde su presencia se correlaciona inversamente con la formación de angiotubos y el retraso en el cierre de las heridas.
2. La ausencia de DLK1 está asociada con un incremento del sprouting en la angiogénesis mientras que la sobreexpresión de Dlk1 inhibe la formación de nuevos vasos in vivo.
3. La regulación de la expresión de DLK1 está implicada en la regulación de la formación de la vasculatura en condiciones fisiológicas. La ausencia de Dlk1 se correlaciona con hiperangiogénesis focal en la retina, que se manifiesta mediante zonas localizadas de mayor engrosamiento en la vasculatura, así como un aumento también localizado en el “sprouting” y el número de las células “tip” y número de filopodios por célula.
4. La regulación de la expresión de DLK1 está además implicada en procesos patológicos, como la formación de la vasculatura en tumores. DLK1 regula el desarrollo vascular en angiogénesis tumoral en pez zebra, de forma que un aumento en los niveles de la proteína inhibe la formación de los vasos.
5. El mecanismo mediante el cual DLK1 inhibe el proceso de angiogénesis es a través del antagonismo de la ruta de Notch, de forma que cuando hay una sobreexpresión de la proteína hay una disminución de proteínas finales de esta ruta de señalización.
6. Este antagonismo se produce por competencia con los ligandos canónicos de la ruta de Notch.



7. El nivel al que DLK1 es capaz de inhibir de la ruta de Notch es anterior a NICD, posiblemente en la interacción con el receptor. Así una vez que está activada la ruta y está presente la forma activa del receptor, DLK1 es incapaz de ejercer su efecto sobre la misma.
8. Además DLK1 puede estar ejerciendo su efecto a través de otras rutas implicadas en el proceso de angiogénesis, como la ruta del TGF- $\beta$ . En el modelo de células endoteliales procedentes de animales carentes de Dlk1, la respuesta al TGF- $\beta$  es mayor.
9. Por los resultados obtenidos en este trabajo puede decirse que DLK1 podría estar implicada en la regulación del proceso de angiogénesis, no solamente de manera fisiológica, sino también en patología, como en tumores. DLK1 es un candidato a considerar en el tratamiento de tumores, donde los inhibidores que se utilizan de forma rutinaria no son totalmente efectivos o se llega a desarrollar resistencia a los mismos después del tratamiento.





## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Chung, A.S. and N. Ferrara, *Developmental and pathological angiogenesis*. Annual review of cell and developmental biology, 2011. **27**: p. 563-84.
2. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2007. **8**(6): p. 464-78.
3. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. The Journal of cell biology, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
4. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-87.
5. Kim, Y., *The effects of nutrient depleted microenvironments and delta-like 1 homologue (DLK1) on apoptosis in neuroblastoma*. Nutr Res Pract. **4**(6): p. 455-61.
6. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annual review of cell and developmental biology, 1995. **11**: p. 73-91.
7. Adams, R.H., et al., *Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis*. Genes & development, 1999. **13**(3): p. 295-306.
8. Gerety, S.S., et al., *Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development*. Molecular cell, 1999. **4**(3): p. 403-14.
9. Wang, H.U., Z.F. Chen, and D.J. Anderson, *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4*. Cell, 1998. **93**(5): p. 741-53.
10. Iso, T., et al., *Dll4-selective Notch signaling induces ephrinB2 gene expression in endothelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **341**(3): p. 708-14.

11. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nature medicine, 2003. **9**(6): p. 653-60.
12. Cueni, L.N. and M. Detmar, *New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease*. The Journal of investigative dermatology, 2006. **126**(10): p. 2167-77.
13. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
14. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
15. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
16. Ferrara, N., et al., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
17. Miquerol, L., B.L. Langille, and A. Nagy, *Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression*. Development, 2000. **127**(18): p. 3941-6.
18. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. Molecular biology of the cell, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
19. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*. Angiogenesis, 2006. **9**(4): p. 225-30; discussion 231.
20. Hiratsuka, S., et al., *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(16): p. 9349-54.
21. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(41): p. 25646-54.

22. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
23. Hiratsuka, S., et al., *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis*. Cancer cell, 2002. **2**(4): p. 289-300.
24. LeCouter, J., et al., *Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1*. Science, 2003. **299**(5608): p. 890-3.
25. Lichtenberger, B.M., et al., *Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development*. Cell, 2010. **140**(2): p. 268-79.
26. Wu, Y., et al., *Anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 antagonist antibody as a therapeutic agent for cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2006. **12**(21): p. 6573-84.
27. Olofsson, B., et al., *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(20): p. 11709-14.
28. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 946-53.
29. Neufeld, G. and O. Kessler, *The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(8): p. 632-45.
30. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
31. Holderfield, M.T. and C.C. Hughes, *Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis*. Circ Res, 2008. **102**(6): p. 637-52.
32. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
33. Louvi, A. and S. Artavanis-Tsakonas, *Notch signalling in vertebrate neural development*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 93-102.

34. Karsan, A., *The role of notch in modeling and maintaining the vasculature*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. **83**(1): p. 14-23.
35. D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, and G. Weinmaster, *Canonical and non-canonical Notch ligands*. Curr Top Dev Biol, 2010. **92**: p. 73-129.
36. Fleming, R.J., *Structural conservation of Notch receptors and ligands*. Seminars in cell & developmental biology, 1998. **9**(6): p. 599-607.
37. Fortini, M.E., *Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 673-84.
38. Weinmaster, G., *Notch signal transduction: a real rip and more*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(4): p. 363-9.
39. Mumm, J.S. and R. Kopan, *Notch signaling: from the outside in*. Dev Biol, 2000. **228**(2): p. 151-65.
40. Wu, L., et al., *MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors*. Nature genetics, 2000. **26**(4): p. 484-9.
41. Wallberg, A.E., et al., *p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(22): p. 7812-9.
42. Tien, A.C., A. Rajan, and H.J. Bellen, *A Notch updated*. The Journal of cell biology, 2009. **184**(5): p. 621-9.
43. Hiratochi, M., et al., *The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway*. Nucleic acids research, 2007. **35**(3): p. 912-22.
44. Martinez Arias, A., V. Zecchini, and K. Brennan, *CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development?* Current opinion in genetics & development, 2002. **12**(5): p. 524-33.
45. Lobov, I.B., et al., *Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3219-24.
46. Blanco, R. and H. Gerhardt, *VEGF and Notch in tip and stalk cell selection*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2013. **3**(1): p. a006569.

47. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 1-9.
48. Goumans, M.J. and C. Mummery, *Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice*. The International journal of developmental biology, 2000. **44**(3): p. 253-65.
49. Pardali, E., M.J. Goumans, and P. ten Dijke, *Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease*. Trends in cell biology, 2010. **20**(9): p. 556-67.
50. Gordon, K.J. and G.C. Blobe, *Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1782**(4): p. 197-228.
51. Ruiz-Ortega, M., et al., *TGF-beta signaling in vascular fibrosis*. Cardiovascular research, 2007. **74**(2): p. 196-206.
52. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
53. Gatz, C.E., S.Y. Oh, and G.C. Blobe, *Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer*. Cellular signalling, 2010. **22**(8): p. 1163-74.
54. Bernabeu, C., J.M. Lopez-Novoa, and M. Quintanilla, *The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer*. Biochimica et biophysica acta, 2009. **1792**(10): p. 954-73.
55. Larrivee, B., et al., *ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway*. Developmental cell, 2012. **22**(3): p. 489-500.
56. Moya, I.M., et al., *Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades*. Developmental cell, 2012. **22**(3): p. 501-14.
57. Blokzijl, A., et al., *Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3*. The Journal of cell biology, 2003. **163**(4): p. 723-8.
58. Le Borgne, R., A. Bardin, and F. Schweisguth, *The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling*. Development, 2005. **132**(8): p. 1751-62.
59. Hurlbut, G.D., et al., *Crossing paths with Notch in the hyper-network*. Current opinion in cell biology, 2007. **19**(2): p. 166-75.



60. Stenflo, J., Y. Stenberg, and A. Muranyi, *Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions*. Biochimica et biophysica acta, 2000. **1477**(1-2): p. 51-63.
61. Dikic, I. and M.H. Schmidt, *Notch: Implications of endogenous inhibitors for therapy*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2010. **32**(6): p. 481-7.
62. Waddell, J.N., et al., *Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration*. PLoS One. **5**(11): p. e15055.
63. Henderson, S.T., et al., *lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of C. elegans*. Development, 1994. **120**(10): p. 2913-24.
64. Tax, F.E., J.J. Yeagers, and J.H. Thomas, *Sequence of C. elegans lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of Drosophila*. Nature, 1994. **368**(6467): p. 150-4.
65. Pintar, A., et al., *The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference?* Biology direct, 2007. **2**: p. 19.
66. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
67. Fischer, A. and M. Gessler, *Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors*. Nucleic acids research, 2007. **35**(14): p. 4583-96.
68. Fisher, A.L., S. Ohsako, and M. Caudy, *The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(6): p. 2670-7.
69. Paroush, Z., et al., *Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins*. Cell, 1994. **79**(5): p. 805-15.
70. Klinakis, A., et al., *Myc is a Notch1 transcriptional target and a requisite for Notch1-induced mammary tumorigenesis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(24): p. 9262-7.
71. Krejci, A., et al., *Direct response to Notch activation: signaling crosstalk and incoherent logic*. Science signaling, 2009. **2**(55): p. ra1.

72. Palomero, T., et al., *NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(48): p. 18261-6.
73. Weng, A.P., et al., *c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma*. Genes & development, 2006. **20**(15): p. 2096-109.
74. Jeffries, S., D.J. Robbins, and A.J. Capobianco, *Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(11): p. 3927-41.
75. Joshi, I., et al., *Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1689-98.
76. Ronchini, C. and A.J. Capobianco, *Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic)*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(17): p. 5925-34.
77. Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. The EMBO journal, 2001. **20**(13): p. 3427-36.
78. Deftos, M.L., et al., *Correlating notch signaling with thymocyte maturation*. Immunity, 1998. **9**(6): p. 777-86.
79. Kishi, N., et al., *Murine homologs of deltex define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis*. International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience, 2001. **19**(1): p. 21-35.
80. Krebs, L.T., et al., *The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway*. Developmental biology, 2001. **238**(1): p. 110-9.
81. Lamar, E., et al., *Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway*. Genes & development, 2001. **15**(15): p. 1885-99.

82. Hori, K., et al., *Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling*. Development, 2004. **131**(22): p. 5527-37.
83. Yashiro-Ohtani, Y., et al., *Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A*. Genes & development, 2009. **23**(14): p. 1665-76.
84. Berset, T., et al., *Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during C. elegans vulval development*. Science, 2001. **291**(5506): p. 1055-8.
85. Yoo, A.S., C. Bais, and I. Greenwald, *Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in C. elegans vulval development*. Science, 2004. **303**(5658): p. 663-6.
86. Bray, S. and F. Bernard, *Notch targets and their regulation*. Current topics in developmental biology, 2010. **92**: p. 253-75.
87. Timmerman, L.A., et al., *Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation*. Genes & development, 2004. **18**(1): p. 99-115.
88. Niessen, K., et al., *Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization*. The Journal of cell biology, 2008. **182**(2): p. 315-25.
89. Saad, S., et al., *Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2010. **42**(7): p. 1115-22.
90. Zhang, J., et al., *Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin*. J Biol Chem. **286**(10): p. 8055-66.
91. Jorge Laborda, E.A.S., Thomas Hoffman, and Vicente Notarioli, *dlk, a putative mamalian Homeotic Gene Differentially Expressed in Small Cell Lung Carcinoma and Neuroendocrine Tumor Cell Line*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1993. **268**(6): p. 3817-3820.
92. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation*. Cell, 1993. **73**(4): p. 725-34.

93. Jensen, C.H., et al., *Protein structure of fetal antigen 1 (FA1). A novel circulating human epidermal-growth-factor-like protein expressed in neuroendocrine tumors and its relation to the gene products of dlk and pG2*. Eur J Biochem, 1994. **225**(1): p. 83-92.
94. Lee, Y.L., et al., *dlk, pG2 and Pref-1 mRNAs encode similar proteins belonging to the EGF-like superfamily. Identification of polymorphic variants of this RNA*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1261**(2): p. 223-32.
95. Schmidt, J.V., et al., *The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 1997-2002.
96. da Rocha, S.T., et al., *Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control*. Dev Biol, 2007. **306**(2): p. 810-23.
97. Yevtodiyenko, A. and J.V. Schmidt, *Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta*. Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1115-23.
98. Floridon, C., et al., *Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation*. Differentiation; research in biological diversity, 2000. **66**(1): p. 49-59.
99. Larsen, J.B., et al., *Fetal antigen 1 and growth hormone in pituitary somatotroph cells*. Lancet, 1996. **347**(8995): p. 191.
100. Tornehave, D., et al., *FA1 immunoreactivity in endocrine tumours and during development of the human fetal pancreas; negative correlation with glucagon expression*. Histochemistry and cell biology, 1996. **106**(6): p. 535-42.
101. Smas, C.M., D. Green, and H.S. Sul, *Structural characterization and alternate splicing of the gene encoding the preadipocyte EGF-like protein pref-1*. Biochemistry, 1994. **33**(31): p. 9257-65.
102. Cynthia M. Smas, D.G., and Hei Sook Sul, *Structural Characterization and Alternate Splicing of the Gene Encoding the Preadipocyte EGF-like Protein Pref-1*. Biochemistry, 1994. **33**: p. 9257-9265.
103. Golozoubova, V., et al., *Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors*. Molecular endocrinology, 2004. **18**(2): p. 384-401.

104. Bianco, A.C., X.Y. Sheng, and J.E. Silva, *Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis*. The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(34): p. 18168-75.
105. Klaus, S., et al., *Characterization of the novel brown adipocyte cell line HIB 1B. Adrenergic pathways involved in regulation of uncoupling protein gene expression*. Journal of cell science, 1994. **107** ( Pt 1): p. 313-9.
106. Hagan, J.P., et al., *At least ten genes define the imprinted Dlk1-Dio3 cluster on mouse chromosome 12qF1*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4352.
107. Paulsen, M., et al., *Comparative sequence analysis of the imprinted Dlk1-Gtl2 locus in three mammalian species reveals highly conserved genomic elements and refines comparison with the Igf2-H19 region*. Genome Res, 2001. **11**(12): p. 2085-94.
108. Charlier, C., et al., *Human-ovine comparative sequencing of a 250-kb imprinted domain encompassing the callipyge (clpg) locus and identification of six imprinted transcripts: DLK1, DAT, GTL2, PEG11, antiPEG11, and MEG8*. Genome Res, 2001. **11**(5): p. 850-62.
109. Stadtfeld, M., et al., *Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells*. Nature genetics, 2012. **44**(4): p. 398-405, S1-2.
110. Liu, L., et al., *Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(25): p. 19483-90.
111. Gordon, W.R., K.L. Arnett, and S.C. Blacklow, *The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective*. Journal of cell science, 2008. **121**(Pt 19): p. 3109-19.
112. Komatsu, H., et al., *OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during Caenorhabditis elegans vulval development*. PLoS Biol, 2008. **6**(8): p. e196.
113. Ferron, S.R., et al., *Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 381-5.
114. Metsuyanin, S., et al., *Expression of stem cell markers in the human fetal kidney*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6709.

115. Harkness, L., et al., *Isolation and differentiation of chondrocytic cells derived from human embryonic stem cells using dlk1/FA1 as a novel surface marker*. Stem Cell Rev, 2009. **5**(4): p. 353-68.
116. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends in molecular medicine, 2001. **7**(6): p. 259-64.
117. Kaneta, M., et al., *A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 256-64.
118. Moore, K.A., et al., *Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor-like repeat motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 4011-6.
119. Miyazato, A., et al., *Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction*. Blood, 2001. **98**(2): p. 422-7.
120. Ohno, N., et al., *dlk inhibits stem cell factor-induced colony formation of murine hematopoietic progenitors: Hes-1-independent effect*. Stem Cells, 2001. **19**(1): p. 71-9.
121. Smas, C.M., L. Chen, and H.S. Sul, *Cleavage of membrane-associated pref-1 generates a soluble inhibitor of adipocyte differentiation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 977-88.
122. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Molecular mechanisms of adipocyte differentiation and inhibitory action of pref-1*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1997. **7**(4): p. 281-98.
123. Boney, C.M., et al., *Regulation of preadipocyte factor-1 gene expression during 3T3-L1 cell differentiation*. Endocrinology, 1996. **137**(7): p. 2923-8.
124. Garces, C., et al., *Adipocyte differentiation is modulated by secreted delta-like (dlk) variants and requires the expression of membrane-associated dlk*. Differentiation, 1999. **64**(2): p. 103-14.
125. Bauer, S.R., et al., *Modulated expression of the epidermal growth factor-like homeotic protein dlk influences stromal-cell-pre-B-cell interactions, stromal cell adipogenesis, and pre-B-cell interleukin-7 requirements*. Molecular and cellular biology, 1998. **18**(9): p. 5247-55.



126. Friedman, J.M., *Leptin at 14 y of age: an ongoing story*. The American journal of clinical nutrition, 2009. **89**(3): p. 973S-979S.
127. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Molecular and cellular endocrinology, 2010. **316**(2): p. 129-39.
128. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. The Proceedings of the Nutrition Society, 2001. **60**(3): p. 349-56.
129. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
130. Smas, C.M., et al., *Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31751-8.
131. Smas, C.M., et al., *Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12632-41.
132. Wang, Y., et al., *Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis*. J Nutr, 2006. **136**(12): p. 2953-6.
133. Smas, C.M. and H.S. Sul, *Characterization of Pref-1 and its inhibitory role in adipocyte differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20 Suppl 3**: p. S65-72.
134. Sul, H.S., et al., *Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 4**: p. S15-9.
135. Mei, B., et al., *Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 1): p. 137-44.
136. Wang, Y. and H.S. Sul, *Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 287-302.
137. Wang, Y., et al., *Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation*. Molecular and cellular biology, 2010. **30**(14): p. 3480-92.
138. Wang, Y., et al., *Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation*. Mol Cell Biol. **30**(14): p. 3480-92.

139. Andersen, D.C., et al., *MicroRNA-15a fine-tunes the level of Delta-like 1 homolog (DLK1) in proliferating 3T3-L1 preadipocytes*. Experimental cell research, 2010. **316**(10): p. 1681-91.
140. Abdallah, B.M., et al., *Dlk1/FA1 is a novel endocrine regulator of bone and fat mass and its serum level is modulated by growth hormone*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3111-21.
141. Moon, Y.S., et al., *Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(15): p. 5585-92.
142. Manzoni, M.F., et al., *A patient with maternal chromosome 14 UPD presenting with a mild phenotype and MODY*. Clinical genetics, 2000. **57**(5): p. 406-8.
143. Laborda, J., *The role of the epidermal growth factor-like protein dlk in cell differentiation*. Histol Histopathol, 2000. **15**(1): p. 119-29.
144. Okamoto, M., et al., *Implication of ZOG protein (zona glomerulosa-specific protein) in zone development of the adrenal cortex*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 515-20.
145. Zhang, H., et al., *Insulin-like growth factor-1/insulin bypasses Pref-1/FA1-mediated inhibition of adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20906-14.
146. Lupu, F., et al., *Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth*. Developmental biology, 2001. **229**(1): p. 141-62.
147. Tanimizu, N., et al., *Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 9): p. 1775-86.
148. Samulewicz, S.J., et al., *Expression of preadipocyte factor-1(Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears*. Wound Repair Regen, 2002. **10**(4): p. 215-21.
149. Fukuzawa, R., et al., *Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours*. J Clin Pathol, 2005. **58**(2): p. 145-50.
150. Van Limpt, V.A., et al., *High delta-like 1 expression in a subset of neuroblastoma cell lines corresponds to a differentiated chromaffin cell type*. Int J Cancer, 2003. **105**(1): p. 61-9.



151. Yin, D., et al., *DLK1: increased expression in gliomas and associated with oncogenic activities*. Oncogene, 2006. **25**(13): p. 1852-61.
152. Hubertus, J., et al., *Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors*. Oncology reports, 2011. **25**(3): p. 817-23.
153. Xu, X., et al., *DLK1 as a potential target against cancer stem/progenitor cells of hepatocellular carcinoma*. Molecular cancer therapeutics, 2012. **11**(3): p. 629-38.
154. Yanai, H., et al., *Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency*. J Biochem. **148**(1): p. 85-92.
155. Khoury, H., et al., *An upstream insulator regulates DLK1 imprinting in AML*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2260-3.
156. Davis, E., et al., *Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype*. Curr Biol, 2004. **14**(20): p. 1858-62.
157. Koohmaraie, M., et al., *A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits*. Journal of animal science, 1995. **73**(12): p. 3596-607.
158. Chacon, M.R., et al., *Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(7): p. 1122-9.
159. Katrincsakova, B., et al., *Methylation analysis of the imprinted DLK1-GTL2 domain supports the random parental origin of the IGH-involving del(14q) in B-cell malignancies*. Epigenetics, 2009. **4**(7): p. 469-75.
160. Raghunandan, R., et al., *Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(3): p. 495-507.
161. Isaji, M., et al., *Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo*. British journal of pharmacology, 1997. **122**(6): p. 1061-6.
162. Ponce, M.L., *Tube formation: an in vitro matrigel angiogenesis assay*. Methods in molecular biology, 2009. **467**: p. 183-8.

163. Mikirova, N.A., J.J. Casciari, and N.H. Riordan, *Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo*. Journal of angiogenesis research, 2010. **2**: p. 2.
164. Jarriault, S., et al., *Signalling downstream of activated mammalian Notch*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 355-8.
165. Stahl, A., et al., *The mouse retina as an angiogenesis model*. Investigative ophthalmology & visual science, 2010. **51**(6): p. 2813-26.
166. Dorrell, M.I. and M. Friedlander, *Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina*. Progress in retinal and eye research, 2006. **25**(3): p. 277-95.
167. Pitulescu, M.E., et al., *Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice*. Nature protocols, 2010. **5**(9): p. 1518-34.
168. Lim, D.J., et al., *Enhanced rat islet function and survival in vitro using a biomimetic self-assembled nanomatrix gel*. Tissue engineering. Part A, 2011. **17**(3-4): p. 399-406.
169. Lawson, N.D. and B.M. Weinstein, *In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish*. Developmental biology, 2002. **248**(2): p. 307-18.
170. Parsons, M.J., et al., *Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas*. Mechanisms of development, 2009. **126**(10): p. 898-912.
171. Nicosia, R.F. and S. Villaschi, *Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1995. **73**(5): p. 658-66.
172. Voyta, J.C., et al., *Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein*. The Journal of cell biology, 1984. **99**(6): p. 2034-40.
173. Ji, X., et al., *Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cells by delta-tocotrienol is associated with notch-1 down-regulation*. Journal of cellular biochemistry, 2011. **112**(10): p. 2773-83.
174. Chigurupati, S., et al., *Involvement of notch signaling in wound healing*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1167.

175. Giordano, D., et al., *The hemoglobins of the sub-Antarctic fish *Cottoperca gobio*, a phyletically basal species--oxygen-binding equilibria, kinetics and molecular dynamics*. The FEBS journal, 2009. **276**(8): p. 2266-77.
176. Benedito, R., et al., *The notch ligands *Dll4* and *Jagged1* have opposing effects on angiogenesis*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1124-35.
177. Hellstrom, M., et al., **Dll4* signalling through *Notch1* regulates formation of tip cells during angiogenesis*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 776-80.
178. Gridley, T., *Notch signaling in the vasculature*. Curr Top Dev Biol. **92**: p. 277-309.
179. Hart, W.E., et al., *Measurement and classification of retinal vascular tortuosity*. International journal of medical informatics, 1999. **53**(2-3): p. 239-52.
180. Laborda, J., et al., **dlk*, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(6): p. 3817-20.
181. Bachmann, E., et al., *Mouse fetal antigen 1 (mFA1), the circulating gene product of *mdlk*, *pref-1* and *SCP-1*: isolation, characterization and biology*. Journal of reproduction and fertility, 1996. **107**(2): p. 279-85.
182. Nueda, M.L., et al., *The EGF-like protein *dlk1* inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells*. J Mol Biol, 2007. **367**(5): p. 1281-93.
183. Bray, S.J., et al., *The atypical mammalian ligand *Delta-like* homologue 1 (*Dlk1*) can regulate Notch signalling in *Drosophila**. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 11.
184. Baladron, V., et al., **dlk* acts as a negative regulator of *Notch1* activation through interactions with specific EGF-like repeats*. Exp Cell Res, 2005. **303**(2): p. 343-59.
185. Surmacz, B., et al., **DLK1* promotes neurogenesis of human and mouse pluripotent stem cell-derived neural progenitors via modulating Notch and BMP signalling*. Stem cell reviews, 2012. **8**(2): p. 459-71.
186. Lee, K., et al., *Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (*Pref-1*)*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 453-61.

187. Butterwith, S.C., et al., *Preadipocyte factor-1 expression in the mouse embryo and placenta*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(2): p. 164S.
188. Mortensen, S.B., et al., *Membrane-tethered delta-like 1 homolog (DLK1) restricts adipose tissue size by inhibiting preadipocyte proliferation*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2814-22.
189. Li, L., S.J. Forman, and R. Bhatia, *Expression of DLK1 in hematopoietic cells results in inhibition of differentiation and proliferation*. Oncogene, 2005. **24**(27): p. 4472-6.
190. Nicoli, S. and M. Presta, *The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay*. Nature protocols, 2007. **2**(11): p. 2918-23.
191. Chi Sabins, N., et al., *DLK1: A Novel Target for Immunotherapeutic Remodeling of the Tumor Blood Vasculature*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2013. **21**(10): p. 1958-1968.
192. Sanchez-Solana, B., et al., *The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities*. Biochimica et biophysica acta, 2011. **1813**(6): p. 1153-64.
193. Nueda, M.L., et al., *The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells*. Journal of molecular biology, 2007. **367**(5): p. 1281-93.
194. Nueda, M.L., et al., *dlk1 specifically interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells*. J Mol Biol, 2008. **379**(3): p. 428-42.
195. Shawber, C.J. and J. Kitajewski, *Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2004. **26**(3): p. 225-34.
196. Krebs, L.T., et al., *Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice*. Genes & development, 2000. **14**(11): p. 1343-52.
197. Suchting, S., et al., *The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3225-30.

198. D'Souza, B., A. Miyamoto, and G. Weinmaster, *The many facets of Notch ligands*. Oncogene, 2008. **27**(38): p. 5148-67.
199. Larsson, J., et al., *Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice*. The EMBO journal, 2001. **20**(7): p. 1663-73.
200. Beets, K., et al., *Robustness in angiogenesis: notch and BMP shaping waves*. Trends in genetics : TIG, 2013. **29**(3): p. 140-9.
201. Bai, G., et al., *Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1*. Developmental cell, 2007. **13**(2): p. 283-97.
202. Quillien, A., et al., *BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with Notch*. Development, 2011. **138**(11): p. 2293-302.





# The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis

Patricia Rodríguez<sup>1†</sup>, María Angeles Higuera<sup>1†</sup>, Alvaro González-Rajal<sup>2</sup>, Arántzazu Alfranca<sup>3</sup>, Marta Fierro-Fernández<sup>1</sup>, Rosa Ana García-Fernández<sup>4</sup>, Maria José Ruiz-Hidalgo<sup>5</sup>, María Monsalve<sup>6</sup>, Fernando Rodríguez-Pascual<sup>1,7</sup>, Juan Miguel Redondo<sup>3</sup>, Jose Luis de la Pompa<sup>2</sup>, Jorge Laborda<sup>5</sup>, and Santiago Lamas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Mixto Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Fundación Renal 'Iñigo Álvarez de Toledo', Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Nicolás Cabrera 1, 28029 Madrid, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Biología del Desarrollo y Reparación Cardiovascular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Biología Vascular e Inflamación, CNIC, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain; <sup>6</sup>Departamento de Cardiología Regenerativa, CNIC, and Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid, Spain; and <sup>7</sup>Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC and Institut Català de Ciències Cardiovasculars, Barcelona, Spain

Received 1 August 2011; revised 20 October 2011; accepted 3 November 2011; online publish-ahead-of-print 8 November 2011

Time for primary review: 23 days

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>Aims</b>                | The epidermal growth factor-like protein Delta-like 1 (DLK1) regulates multiple differentiation processes. It resembles NOTCH ligands structurally and is considered a non-canonical ligand. Given the crucial role of the NOTCH pathway in angiogenesis, we hypothesized that DLK1 could regulate angiogenesis by interfering with NOTCH. We therefore investigated the expression and function of DLK1 in the vascular endothelium and its role in the regulation of angiogenesis.   |
| <b>Methods and results</b> | We report DLK1 expression in the endothelium of different species, including human, cow, pig, and mouse. Angiogenesis was studied by using <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> models of angiotube formation in endothelial cells, retinal phenotypes in <i>Dlk1</i> -null mice, and vessel development in zebrafish. DLK1 overexpression strongly inhibited angiotube formation, whereas lung endothelial cells from <i>Dlk1</i> -null mice were highly angiogenic. <i>In vivo</i> studies demonstrated DLK1-mediated inhibition of neovessel formation and revealed an altered pattern of angiogenesis in the retinas of <i>Dlk1</i> -null mice. The expression of human DLK1 in zebrafish embryos severely altered the formation of intersegmental vessels, while knockdown of the orthologous gene was associated with ectopic and increased tumour-induced angiogenesis. NOTCH-dependent signalling as determined by gene expression reporters was inhibited by the presence of DLK1 in vascular endothelial cells. In contrast, <i>Dlk1</i> -null mice showed increased levels of NOTCH downstream targets, such as Snail and Slug. |
| <b>Conclusion</b>          | Our results unveil a novel inhibitory role for DLK1 in the regulation of angiogenesis, mediated by antagonism of the NOTCH pathway, and establish the basis for investigating its action in pathological settings.   |
| <b>Keywords</b>            | Angiogenesis • Delta-like 1 • Pref-1 • Endothelium • NOTCH   |

## 1. Introduction

Delta-like 1 (DLK1), also known as Pref-1 and FA1, is a transmembrane protein pertaining to the epidermal growth factor superfamily and initially described in neuroendocrine tumours and

preadipocytes.<sup>1,2</sup> It has been described that DLK1 affects several differentiation processes, including adipogenesis, muscular and neuronal differentiation, bone differentiation, and haematopoiesis.<sup>3</sup> Several reports from our groups and others support that DLK1 may operate as a non-canonical ligand of the NOTCH pathway, as it

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author. Tel: +34 911964455; fax: +34 911964420, Email: slamas@cbm.uam.es

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.



lacks the DSL domain conserved in classic NOTCH ligands that mediates ligand–receptor interaction.<sup>4–6</sup> This structural feature has been related to its capacity to inhibit NOTCH signalling in different cellular systems and organisms, by the interactions with specific EGF-like repeats of NOTCH.<sup>7</sup> The potentially diverse effects of DLK1 would then depend on the cell context and state of NOTCH activation.<sup>8</sup> To date, information on the presence of DLK1 in adult endothelia is restricted to adipose tissue vascular cells and placental blood vessels,<sup>9,10</sup> and to our knowledge, there are no functional data in the vasculature.

Angiogenesis, defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a central process in embryonic and post-natal life and the object of intense study due to its relevance for tumour progression and therapy.<sup>11</sup> Since the NOTCH signalling pathway is essential for vascular development and physiology by controlling angiogenesis in pre- and post-natal life,<sup>12,13</sup> we reasoned that DLK1 could contribute to regulate this process in adult endothelial cells through the interaction with NOTCH receptors. In this study, we analysed the role of DLK1 in angiogenesis by using a series of *in vitro* and *in vivo* approaches. We find that overexpression of DLK1 inhibits migration and angioblast formation in mammalian vascular endothelial cells and disrupts normal embryonic vascularization in zebrafish. Genetic ablation of DLK1 in mice is associated with increased angiogenesis *in vitro* and with focal areas of retinal hypervascularization. Specific knockdown of the orthologous *Dlk1* of zebrafish results in ectopic angiogenesis. Moreover, in a tumour angiogenesis model in zebrafish, suppression of *Dlk1* promotes vessel migration towards the tumour cell mass. We also find that the NOTCH signalling pathway is targeted by DLK1 in the context of angiogenesis and that DLK1 antagonizes NOTCH-dependent signalling in endothelial cells, while, in contrast, this signalling is enhanced in *Dlk1*-null mice. Collectively, these results reveal a previously unknown role for DLK1 in the vasculature as a regulator of NOTCH-mediated angiogenesis.

## 2. Methods

### 2.1 Adenoviruses

Adenoviruses encoding GFP, DLK1-GFP, or DLK1-HA were obtained from Vector Biolabs. Adenoviruses were purified using the Adeno-X Maxi Purification Kit and titered using the Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech).

### 2.2 Cell culture and animal handling

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) and porcine aortic endothelial cells (PAEC) were obtained from cow and pig aortas at a local slaughterhouse and cultured as described.<sup>14</sup> For isolation of mouse lung endothelial cells (MLEC), mice were sacrificed by cervical dislocation and lungs were excised and collagenase-digested. The mixed population obtained was first subjected to negative selection with anti-FCsRII/III and then to positive selection with anti-ICAM-2 and anti-IgG-coated magnetic beads. MLEC were grown on a mixture of fibronectin, type I collagen, and 0.1% gelatine-coated plates. Isolation of human umbilical vein endothelial cells is described in Supplementary material online. They were obtained from umbilical cords of normal deliveries (after approval by the Ethics Committee of the Hospital 'Rubén Internacional') and in agreement with principles outlined in the Declaration of Helsinki. Animals were handled in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals contained in Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

Approval was granted by the local ethics review board of Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'.

### 2.3 Western blot analysis

Details are provided in Supplementary material online.

### 2.4 Cell proliferation assays

Endothelial cells were at a density of 3000 cells/well. XTT turnover was measured at 0, 24, 48, 72, and 96 h after 4 h incubation at 37°C to allow colour development (Cell Proliferation Kit II). BrdU incorporation at 4, 8, and 24 h was detected by anti-BrdU (1:100), followed by anti-rat (1:200; Alexa 488). Images were taken with a Nikon eclipse TE2000-U inverted-microscope coupled to a digital-sight DS-2Mv.

### 2.5 Cell transfection and luciferase assay

DLK1 plasmid was obtained from Origene (pCMV6 XL4, human cDNA clone, SC127962). A haemagglutinin tag was added (Vector Biolabs). The Hes-1 luciferase reporter construction, containing a 350 bp mouse promoter fragment of the Hes-1 gene inserted upstream of the luciferase gene in pGL2 Basic, has been reported elsewhere.<sup>15</sup> Endothelial cell transfection and determination of luciferase activity are detailed in Supplementary material online.

### 2.6 Scratch assay

Endothelial cell monolayers were mechanically wounded and the rate of coverage of the denuded area was monitored by time-lapse microscopy for 24 h as described,<sup>16</sup> using a Leica AF6000 LX microscopy coupled to a monochromatic Hamamatsu CCD C9100-02.

### 2.7 Tube-like structure formation *in vitro*

The microcapillary-like formation assay was performed by using 96-well culture plates coated with 40 µL of Matrigel (BD Bioscience) as described.<sup>17</sup> Endothelial cells with or without vascular endothelial growth factor (VEGF; 5 ng/mL) were seeded on the polymerized Matrigel and incubated at 37°C for 5–6 h. Angiotubes were stained with MTT. Images were taken with a Nikon eclipse TE2000-U inverted microscope coupled to a digital-sight DS-2Mv. Tube formation was quantified by using the Angioquant software.

### 2.8 Aortic ring assay

Rings of mouse aorta were cultured in three-dimensional gels as described.<sup>18</sup> Thoracic aortas were removed from mice sacrificed by cervical dislocation. Pieces of aortas were immediately exposed or not to recombinant adenoviruses at  $1 \times 10^9$  or  $5 \times 10^9$  plaque-forming units/mL. Four hours after infection, 1 mm long rings were embedded in Growth Factor Reduced Matrigel in 96-well plates. Each well contained 100 µL of MCDB131 supplemented with 2.5% mouse serum, 1% glutamine, and 1% P/S. After 6 days of culture, explants were examined by microscopy. The length of vessels was quantified by ImageJ.

### 2.9 Matrigel plug assay *in vivo*

Growth Factor Reduced Matrigel Phenol Red-free (500 µL), heparin (0.3 mg/mL), and VEGF (250 ng/mL), adenovirus, DAPT (10 mg/kg of body weight) or DMSO (0.01%), as appropriate, were injected subcutaneously in the mice abdominal region. Mice were anaesthetized by injecting (ip) ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg) and constantly monitored by veterinarian surveillance of reflex absence. Animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber after day 10 of implantation, plugs were dissected, and haemoglobin was measured using the TMB method (Sigma). Haemoglobin content was normalized to plug weight. In another set of experiments, plugs were removed for histological examination. Formaldehyde-fixed plugs were embedded in paraffin-wax and

sectioned followed by staining with haematoxylin and eosin and examination under a light microscope (Olympus DX50).

## 2.10 Retinal isolation and staining

P0-P14 pups were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and eyes enucleated and fixed overnight in 1% PFA at 4°C. Then, retinas were dissected out and whole-mount stained with biotinylated isolectin B4 (Sigma-Aldrich) followed by streptavidin, Alexa Fluor 647 conjugate (Invitrogen) as described.<sup>19</sup> Images from 8 to 10 retinas per experimental group were acquired in a Nikon A1R confocal microscope, and quantification of tip cells, filopodia, and vascular areas was carried out with ImageJ software.

## 2.11 Zebrafish DLK1 gain- and loss-of-function assays

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained and raised under standard conditions at 28°C. Transgenic *Tg(fli1:EGFP)* and *Tg(gata1:dsRed)* embryos were used to track endothelial cell populations and blood flow. *Tg(fli1:EGFP)*; *Tg(gata1:dsRed)* were generated by standard crossing of individual lines. A plasmid encoding the human DLK1 cDNA was injected at different concentrations in one-cell stage embryos. The same plasmid without the human DLK1 cDNA was used as a control. Embryos were allowed to develop and pictures were taken at 72 hpf using a dissection microscope equipped with epifluorescence (MZ16FA, Leica) and a digital camera (DFC310FX, Leica). Sequences and experiments regarding anti-sense morpholinos (MO) are described in Supplementary material online.

## 2.12 Zebrafish tumour xenograft angiogenesis assay

*Tg(fli1:EGFP)*<sup>20</sup> embryos were injected at one-cell stage with MO against *zfdLK1* or capped *hDLK1* mRNA or both, and allowed to develop at 28°C. Twenty-four hours post-fertilization fish embryos were incubated with water containing 0.2 mM 1-phenyl-2-thio-urea (Sigma) to prevent pigmentation. At 48 h post-fertilization, zebrafish embryos were dechorionated with the help of a sharp tip forceps and anaesthetized with tricaine (MS-222, Sigma). Anaesthetized embryos were transferred onto a modified agarose gel for microinjection. Before injection, tumour cells were labelled *in vitro* with 2 µg/mL of 1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil, Fluka) and were further incubated for 24 h. Cells were resuspended in DMEM and 2–5 nL of tumour cell solution (25 cells/nL) was injected into the perivitelline cavity of each embryo using an Eppendorf microinjector (Femtojet 5247). After injection, the fish embryos were immediately transferred into housing-keeping water. Injected embryos were kept at 28°C and were examined 2 days after to monitor tumour-induced angiogenesis from subintestinal vessels (SIV) using a fluorescent microscope (MZ16FA, Leica) equipped with a digital camera (MZ16FA, Leica).

## 2.13 Zebrafish NOTCH-reporter assay

*Tg(ptf1a:eGFP)*<sup>h1</sup> is a transgenic NOTCH-responsive zebrafish line harbouring 12 Rbp-Jk-binding sites up-stream of the β-globin minimal promoter and the enhanced Green fluorescent protein reporter gene.<sup>21</sup> *Tg(ptf1a:eGFP)*<sup>h1</sup> embryos were injected at one-cell stage with MO against *zfdLK1* or capped *hDLK1* mRNA or were treated at 36 hpf with DAPT for 12 h and allowed to develop at 28°C. Details of the protocol are described in Supplementary material online.

## 2.14 RNA extraction and real-time PCR

Detailed methods and primers used are described in Supplementary material online, Table S1.

## 2.15 Statistical analysis

Comparisons were evaluated by Student's *t*-test for unpaired data or one-way analysis of variance when parametric tests were possible or by non-parametric tests, as appropriate.

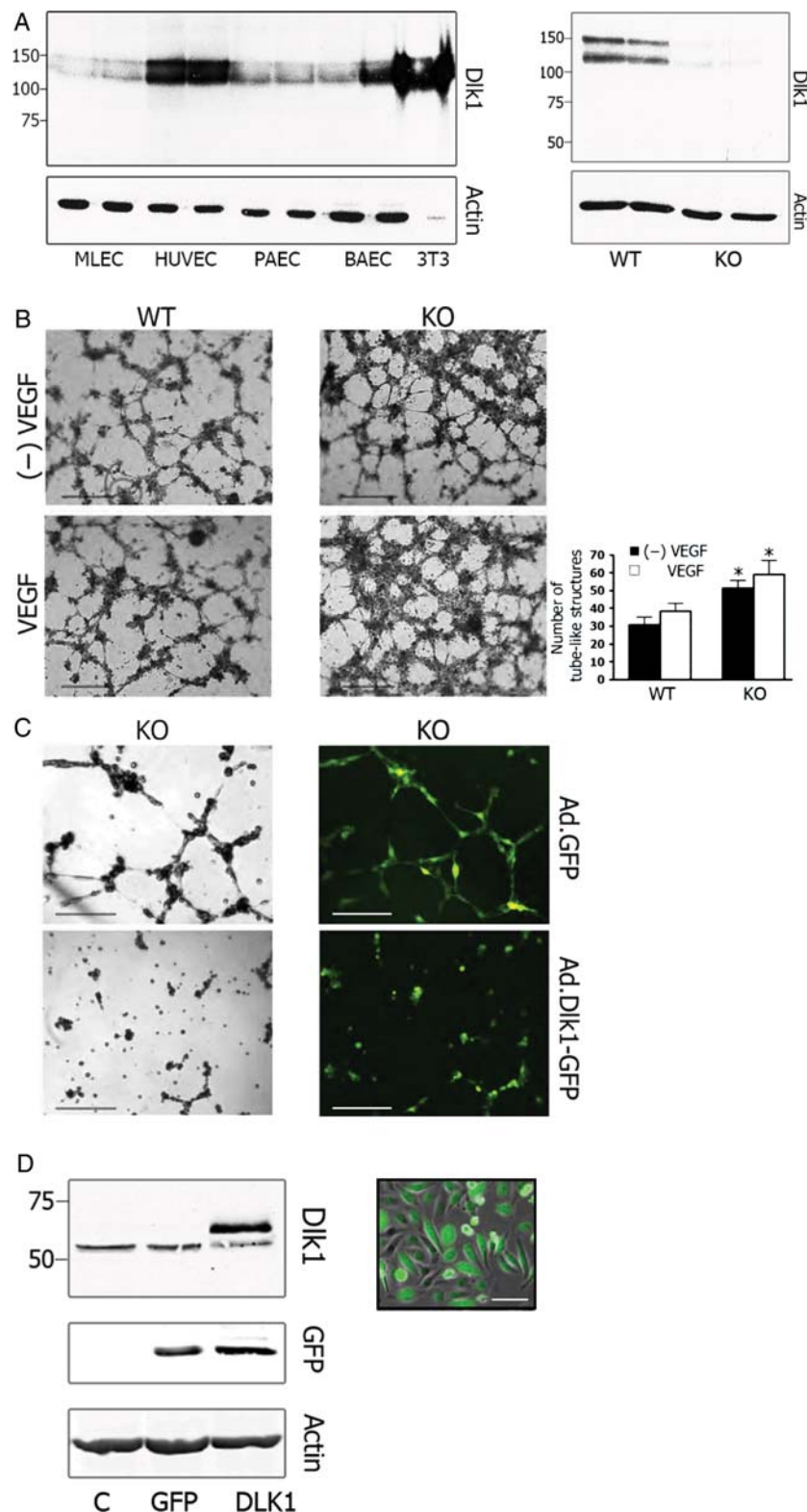
# 3. Results

## 3.1 DLK1 is expressed in endothelial cells where its presence correlates inversely with angiotube formation and delays wound healing

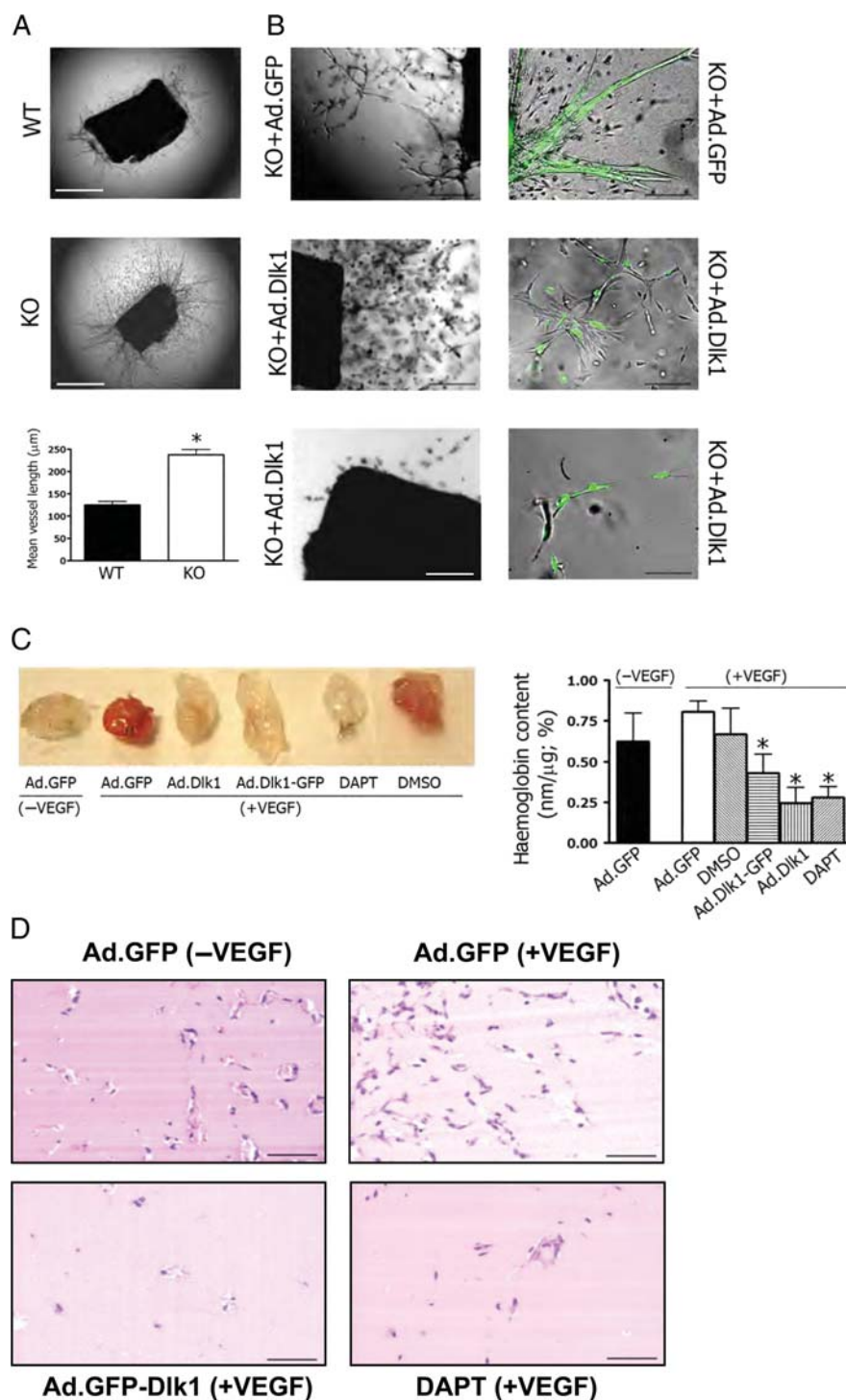
Given the scarce information on DLK1 in the vasculature, we first studied its expression in several endothelial cell types and species. We found that DLK1 was expressed in murine, human, porcine, and bovine adult endothelial cells (Figure 1A). In the description of the phenotype corresponding to the *Dlk1*-null mice, obesity and serious osteo-skeletal malformations were reported<sup>22</sup> but no explicit allusion was made to any changes in the vasculature. For this reason, we undertook studies in MLEC derived from *Dlk1*-null mice<sup>23</sup> and observed increased formation of angiotubes both in the absence and presence of VEGF (Figure 1B). This phenotype was reversed by the introduction of adenoviral expression constructs bearing DLK1 (Figure 1C). In addition, BAEC overexpressing DLK1 showed delayed re-endothelization after 18 h of in-plate endothelial wounding (scratch assay) (see Supplementary material online, Figure S1A). Consistently, wound closure was significantly accelerated in MLEC from *DLK1*-null mice (see Supplementary material online, Figure S1B and C; see Supplementary material online, Videos S1 and S2). To address the contribution of proliferation and/or apoptosis to the final effect observed, we evaluated the consequences of DLK1 suppression in MLEC. We found that the absence of DLK1 significantly correlated with increased cell proliferation (see Supplementary material online, Figure S1D and E). However, DLK1 did not interfere with apoptosis or necrosis (see Supplementary material online, Figure S2). These results suggest a dual inhibitory effect of DLK1 on the migration and proliferation of these endothelial cell types.

## 3.2 The absence of DLK1 is associated with increased sprouting angiogenesis while DLK1 overexpression inhibits neovessel formation *in vivo*

To examine the effect of DLK1 on angiogenesis in an *ex vivo* model, we studied the outgrowth of endothelial cells from aortic explants obtained from WT or *Dlk1*-null mice. Aortic segments from null mice exhibited a significantly higher pro-angiogenic profile (Figure 2A) that was abrogated in a dose-dependent fashion when DLK1 was expressed in aorta explants of the null mutant background (Figure 2B). We then investigated the effect of DLK1 expression constructs in an *in vivo* model of ectopic angiogenesis based on the formation of vessels in Matrigel® plugs implanted subcutaneously in the abdominal region of healthy mice. Whereas VEGF-treated plugs showed macroscopic neovessel formation and increased haemoglobin content, functional vascular structures were drastically reduced in plugs exposed to DLK1 expression constructs compared with controls, an effect comparable in magnitude to that observed in plugs

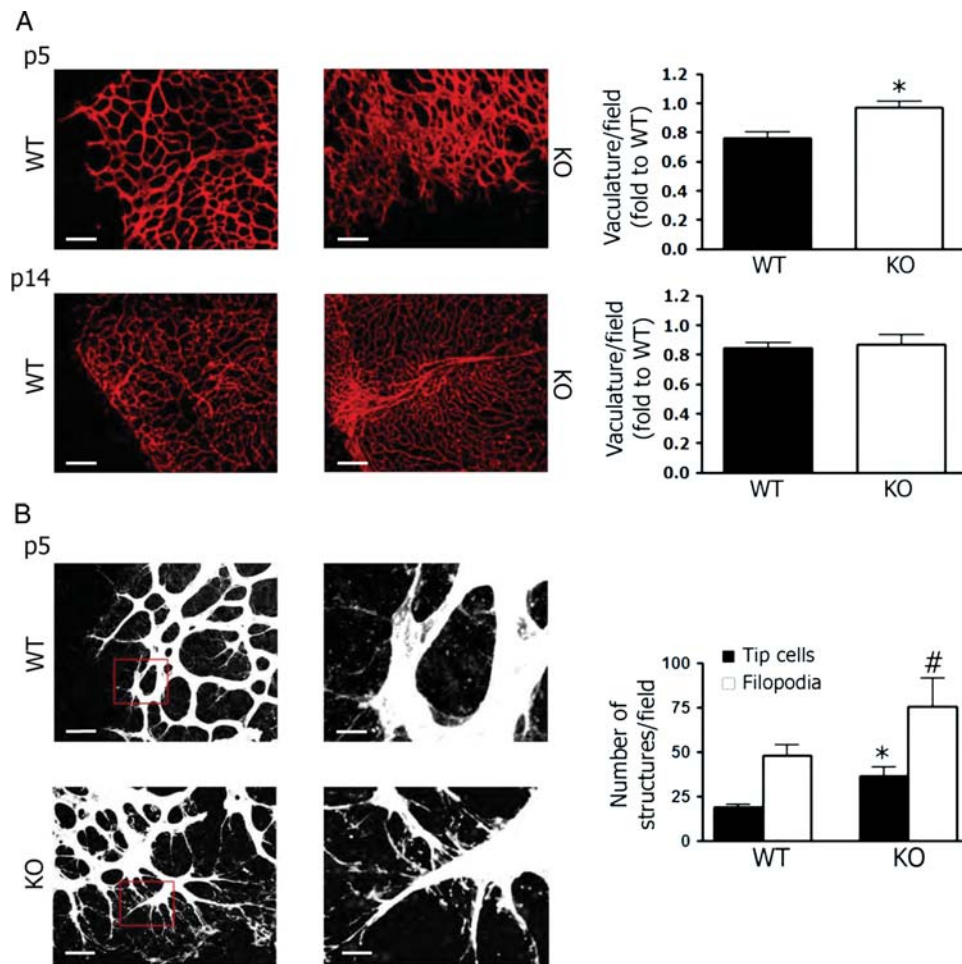


**Figure 1** Expression of DLK1 in adult endothelia and reciprocal relationship between DLK1 and angiogenesis. (A) Left blot showing DLK1 dimer in non-boiled lysates (30  $\mu$ g) of endothelial cells from mouse (MLEC), human (HUVEC), pig (PAEC), and cow (BAEC) as well as 3T3 cells (1  $\mu$ g) by a specific antibody.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. Right blot showing non-boiled lysates from MLEC WT and KO. Samples were assayed from two independent preparations. (B) Representative images from wild-type and DLK1-null isolated MLEC in the presence or absence of VEGF. Quantitative analysis represents the number of tube-like structures from three independent preparations per group. Values are presented as mean  $\pm$  SEM assayed per duplicate (\* $P$  < 0.05). (C) Cells from DLK1 null were infected with adenoviruses GFP or DLK1-GFP. (D) Lysates (45  $\mu$ g) from cells infected with adenoviruses GFP or DLK1-GFP were incubated with DLK1, GFP, and actin antibodies. Representative image of endothelial cells 24 h after infection at a multiplicity of infection of 500 showing an infection efficiency of  $\sim$ 90%. Scale bars: B: 500; C: 100 and D: 50  $\mu$ m.



**Figure 2** DLK1 regulates angiogenesis *in vivo*. (A) Representative images from wild-type and DLK1-null aorta segments. The quantification of vessel-like structures length (lower panel) shows an increase in neovessel outgrowth from explants of null mice. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of  $n = 35$  rings from six mice;  $*P < 0.05$ . (B) The pro-angiogenic response of the null mice is abolished in explants pre-incubated with a DLK1 adenovirus in a concentration-dependent manner,  $1 \times 10^9$  (middle panel) and  $5 \times 10^9$  (lower panel) plaque-forming units/mL compared with GFP adenovirus (upper panel). (C) Ectopic angiogenesis was analysed in Matrigel plugs containing adenovirus ( $1 \times 10^9$  plaque-forming units/mL) control, or plugs containing VEGF plus adenovirus control, Ad.DLK1, Ad.DLK1-GFP, DAPT, or vehicle (DMSO). Photograph of plugs after 10 days of implantation. The quantification of haemoglobin content (right panel) shows that the VEGF pro-angiogenic effect is reduced in plugs containing DLK1 or DAPT. Values represent mean  $\pm$  SEM from six mice ( $*P < 0.05$  vs. Ad.GFP plus VEGF). (D) Haematoxylin- and eosin-stained sections of the plugs show decreased vascularization in Ad.DLK1, Ad.DLK1-GFP, and DAPT-treated plugs. Scale bars: A: 1 mm; B: 100  $\mu\text{m}$ ; D: 50  $\mu\text{m}$ .





**Figure 3** Altered retinal angiogenesis in DLK1-null mice. (A) Confocal images of retinas from wild-type or DLK1-null p5 and p14 pups stained for isolectin B4. Retinas of null mice p5 show a hyperfused plexus compared with wild-type. Right panel depicts the quantification of retinal areas covered by vessels. Bars represent mean  $\pm$  SEM from 10 mice (\* $P < 0.05$ ). (B) Isolectin B4 immunofluorescence showing increased tip cell and filopodia in the DLK1-null p5 pups angiogenic front. Squared areas are blown-up in the right panels. Bar graph depicts the quantitative analysis of tip cells and filopodia (\* $P < 0.05$ ). Scale bars: A: 200; B: 50 (left side) and 20 (right side)  $\mu\text{m}$ .

treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT which is a established inhibitor of the NOTCH pathway<sup>24</sup> (Figure 2C and D).

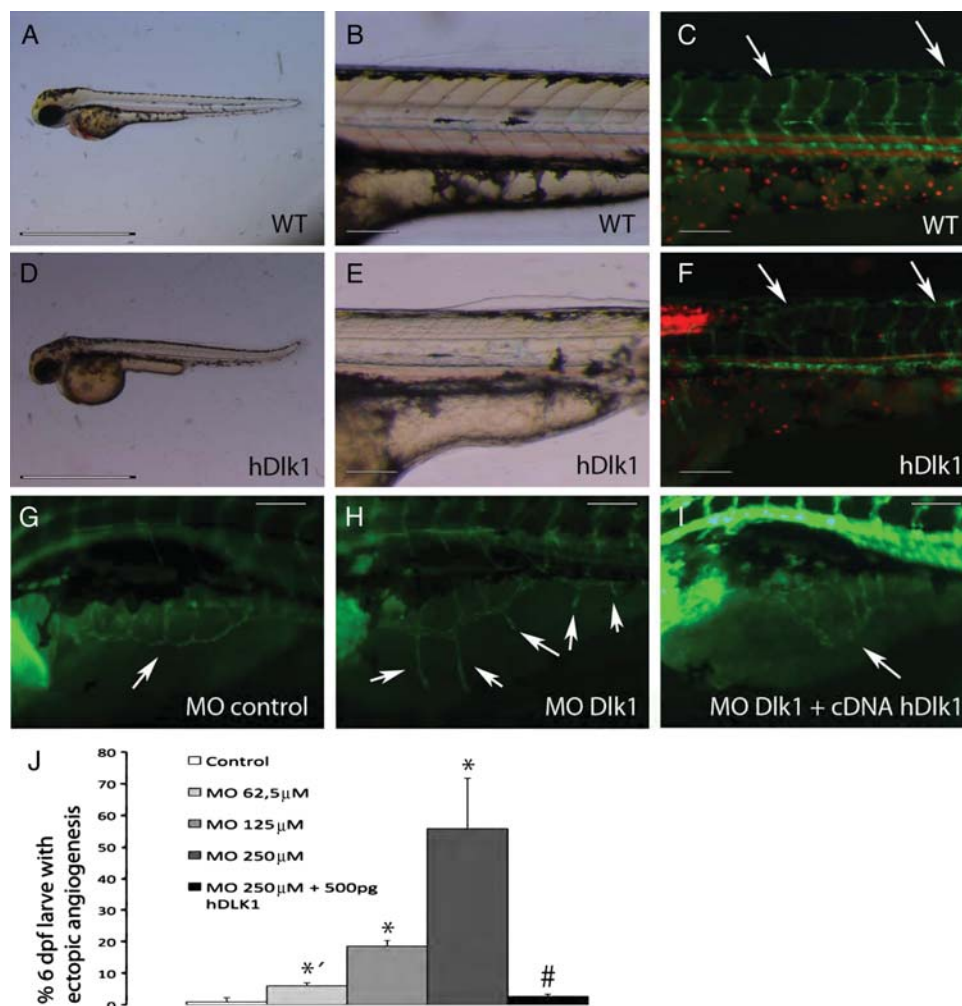
### 3.3 The absence of DLK1 correlates with focal retinal hyperangiogenesis

To confirm the antiangiogenic role of DLK1 *in vivo*, we studied the potential differences in retinal vessel formation in *Dlk1*-null mice compared with their wild-type counterparts. Retinas from null mice showed focal hypervascularization at p5 and p14 (Figure 3A; see Supplementary material online, Figure S3). This hypervascularization was enhanced at p5, indicating a more prominent role of DLK1 in the regulation of vascular leading edge progression (p5) than in remodeling (p14). In the developing murine retina, sprouting angiogenesis correlates well with the formation of endothelial tip cells and filopodia.<sup>12</sup> A detailed study of the affected regions in the retinas of *Dlk1*-null mice demonstrated an increased number of filopodia and tip cells (Figure 3B), consistent with a dysregulation of angiogenesis. Collectively, our results indicate that DLK1 acts as a brake for

proliferation, migration, and angiogenesis in the vascular endothelium of post-natal mammals.

### 3.4 DLK1 regulates vascular development and tumour angiogenesis in zebrafish

To investigate whether the role of DLK1 in angiogenesis could be extended to other vertebrate models, we performed experiments in embryos from *Danio Rerio* (zebrafish), in which the human version of DLK1 was microinjected and overexpressed in one-cell stage embryo. Three days after the injection, embryos expressing DLK1 showed an abnormal pattern of dorsal vascularization that was DLK1 dose-dependent, manifested in aberrant intersegmental vessel branching and a lack of an established dorsal longitudinal anastomotic vessel (Figure 4A–F; see Supplementary material online, Figure S4). To decipher whether DLK1 played a role by itself in the development of zebrafish vasculature, the endogenous orthologous mRNA was targeted with an MO. Upon MO injection, 6 days old larvae showed ectopic subintestinal angiogenesis (Figure 4G–J). This phenotype was MO dose-dependent and was rescued by the concomitant



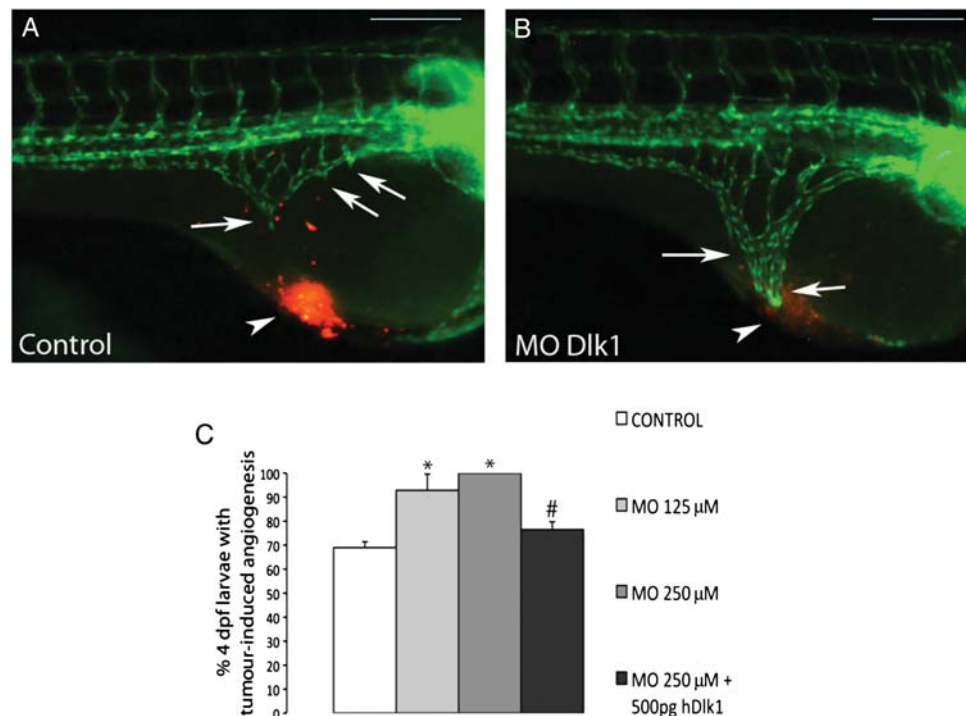
**Figure 4** DLK1 affects angiogenesis in WT zebrafish embryos. (A–F) Tg(fli:eGFP); Tg(gata1:dsRed) embryos at 72 h post-fertilization. (G–I) Tg(fli:eGFP) at day 6 post-fertilization. (A, B, D, and E) Bright-field images. (C and F) Fluorescent microscope images. General morphology of wild-type embryos (A) and intersegmental artery sprouts and GATA-dsRED-labelled erythrocytes (B and C) from a wild-type embryo injected with 500 pg of control cDNA plasmid. (D–F) Embryos injected with 500 pg of DLK1 cDNA. In (C) and (F), arrows highlight intersegmental arteries. (G) Embryo injected with 250 μM control MO oligonucleotide (MO control). (H) Ectopic sprouts of the SIV in a DLK1-morphant embryo. (I) Phenotype after co-injection of DLK1 MO (MO Dlk1) and DLK1 cDNA. (J) Quantification of ectopic angiogenesis in day 6 pf larvae injected with control MO, DLK1 MO alone, or co-injected with human DLK1 plasmid (hDLK1). Arrows identify SIV. Each experiment, which included 100–300 embryos, was repeated at least twice. Bars represent mean  $\pm$  SEM (\* $P$  < 0.05 vs. control; \* $P$  < 0.025 vs. control; # $P$  < 0.025 vs. MO 250 μM). Scale bars: A and D: 2 mm; B, C and E–I: 200 μm.

expression of human DLK1 (Figure 4J). In a model of zebrafish xenograft tumour formation,<sup>25</sup> suppression of DLK1 resulted in a clearly visible migration of vessels towards the tumour cell mass, an effect reversed by co-injection with human DLK1 mRNA (Figure 5A–C). Our results suggest that DLK1 plays a role in the developing vasculature of zebrafish, hence supporting that this protein contributes to setting the general angiogenic programme.

### 3.5 DLK1 inhibits angiogenesis by antagonizing the NOTCH pathway

To study the potential interaction of DLK1 with the NOTCH signalling pathway in the context of angiogenesis, we used several approaches. First, we found that expression of the NOTCH-dependent luciferase reporter Hes-1 was reduced in a dose-dependent manner, in endothelial

cells expressing DLK1 (Figure 6A). This occurred at levels similar to the effect observed after treatment with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT (Figure 6B). We then studied the abundance of NOTCH signalling pathway-related proteins in MLEC from *Dlk1*-null mice and observed that the levels of the Notch1 intracellular domain (NICD) indicative of Notch1 activation and the downstream transcriptional effector Hey1 were markedly augmented (Figure 6C), thus suggesting that the absence of *Dlk1* might contribute to derepress the Notch pathway. As Notch receptors have been shown to regulate Snail family of proteins in specific types of endothelial cells,<sup>26,27</sup> we examined whether their expression was altered in endothelial cells from *Dlk1*-null mice. We found increased levels of Snail mRNA and Slug protein in MLEC of *Dlk1*-null mice, compared with MLEC from wild-type mice (Figure 6D), suggesting that *Dlk1* is inhibiting the expression of Snail and Slug.



**Figure 5** Knockdown of DLK1 promotes, and DLK1 inhibits, tumour-induced angiogenesis in zebrafish xenograft assay. Fluorescent microscopic images of (A) 4 dpf control and (B) MO-injected larvae xenografted with MDA-MB-435 tumour cells at 2 dpf. Arrows highlight SIV and arrowheads identify tumour cells. (C) Quantification of embryos showing tumour-induced angiogenesis when injected with MO against DLK1 at different concentrations or co-injected with human Dlk1 capped mRNA. Each condition, which included 25–50 embryos, was repeated at least twice. Bars represent mean  $\pm$  SEM (\* $P$  < 0.025 vs. control; # $P$  < 0.025 vs. MO 250  $\mu$ M). Scale bars: 200  $\mu$ m.

### 3.6 DLK1 inhibits angiogenesis upstream of NOTCH intracellular signalling

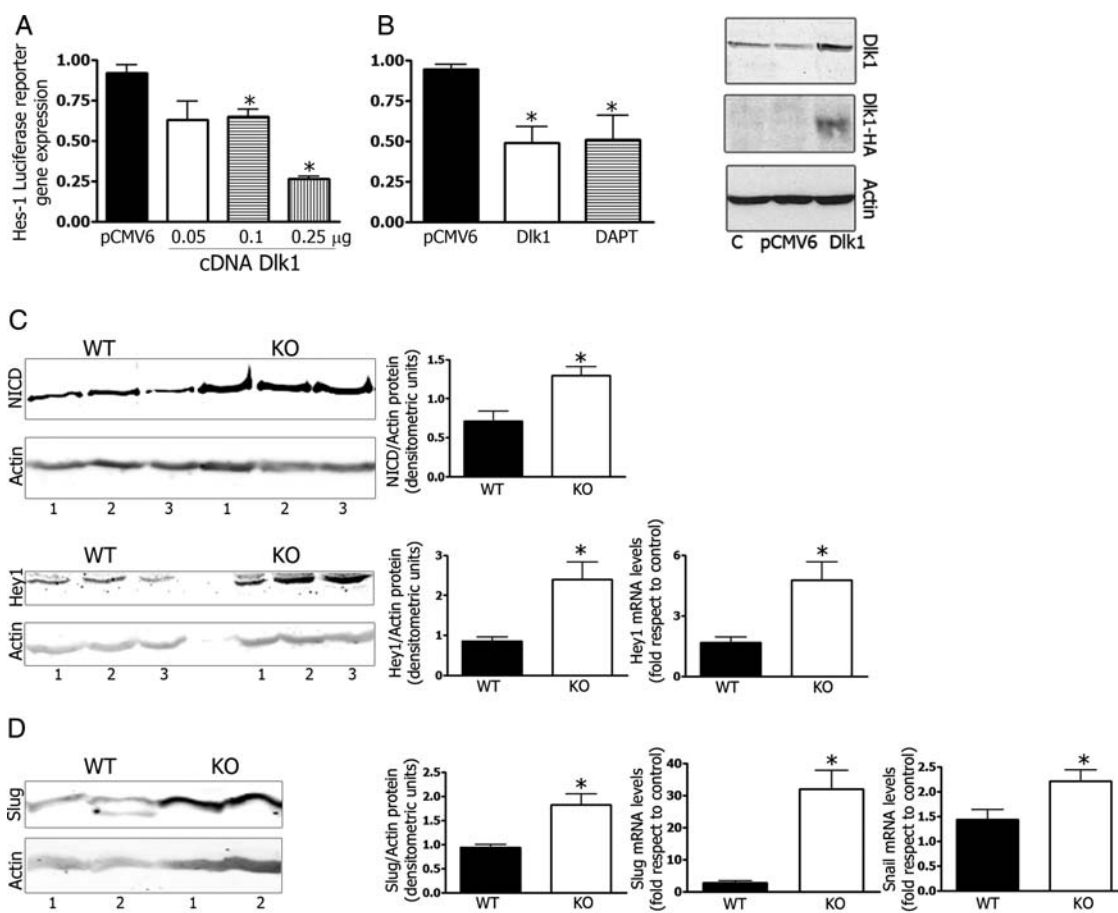
To evaluate the step at which DLK1 was interfering with the NOTCH signalling pathway, we performed studies of angiotube formation in PAEC in resting conditions and in PAEC overexpressing NICD, which are engineered to express active NOTCH-dependent signals in a ligand–receptor independent manner. In keeping with previous reports,<sup>27</sup> PAEC stably expressing NICD showed high levels of Hes-1-dependent luciferase expression (data not shown). Expression of DLK1 resulted in the expected inhibition of angiotube formation, both in the presence and absence of VEGF (see Supplementary material online, Figure S5, upper panels). In contrast, angiotube formation in cells with constitutive NICD expression was not reduced by DLK1 (see Supplementary material online, Figure S5, lower panels), thus suggesting that DLK1 acts at the level of NOTCH receptors to regulate angiogenesis. To confirm that DLK1 was also inhibiting NOTCH signalling in another model, we performed a series of studies in zebrafish embryos expressing the NOTCH-dependent fluorescent effector RbpJk. As shown in Supplementary material online, Figure S6A and B, DAPT drastically reduced fluorescence associated with NOTCH signalling, while antagonism of DLK1 with an MO moderately enhanced it (see Supplementary material online, Figure S6C). In contrast, injection of embryos with the human Dlk1 mRNA promoted a marked abrogation of NOTCH-dependent fluorescence (see Supplementary material online, Figure S6D). Taken together, these results support the notion that DLK1 is negatively regulating

NOTCH signalling, likely by interfering with canonical ligand–receptor interaction.

## 4. Discussion

Since the initial description of DLK1 as an inhibitor of adipocyte and neuroendocrine differentiation, a growing body of evidence suggests that it may act as a general inhibitor of differentiation, including cell types of non-neuroendocrine lineage such as osteoblasts,<sup>28</sup> myocytes,<sup>29</sup> haematopoietic cells,<sup>30</sup> and chondrocytes.<sup>31</sup> Work by one of our groups has established that DLK1 may antagonize the NOTCH pathway in several settings and that this antagonism relies on its capacity to act as a non-canonical ligand.<sup>4</sup> Precisely, because an essential role of the NOTCH pathway is to regulate angiogenesis, we asked what role, if any, could be played by DLK1 in the context of this fundamental biological process. This work shows for the first time to our knowledge that DLK1 is: (i) expressed in adult endothelial cells and (ii) it acts as a powerful antiangiogenic factor in several models and organisms. Furthermore, we have been able to provide evidence supporting that this inhibition of angiogenesis is mediated by interference with the NOTCH pathway and plausibly with canonical ligand–receptor interaction.

Several reports lend a basis for the interaction between DLK1 and the NOTCH 1 receptor, suggesting that the former exerts an antagonistic role due to its capacity to bind to those NOTCH EGF-like repeats also involved in the interaction with NOTCH ligands.<sup>4,7,8</sup>



**Figure 6** DLK1 inhibits angiogenesis by antagonizing the NOTCH signalling pathway. (A) Quantification of NOTCH signalling in bovine endothelial cells measured by Hes-1 activity. (B) cDNA DLK1 (0.25  $\mu$ g) decreases Hes-1 activity to a similar extent than 0.5  $\mu$ M of the  $\gamma$ -secretase inhibitor, DAPT. Bars represent mean  $\pm$  SEM of three independent experiments assayed per triplicate (\* $P$  < 0.05). Lysates from control cells or cells transfected with a control vector or with DLK1-HA (50  $\mu$ g) were incubated with DLK1, HA, and actin antibodies. Densitometric analysis yielded a 2.5-fold increased DLK1 protein with respect to controls. (C) Representative western blots ( $n$  = 3) from Notch intracellular domain (NICD, upper panel) and Hey1 (lower panel) showing protein up-regulation in lung endothelial cells from KO mice. Quantification of four different mouse preparations per group by densitometry and qRT-PCR (mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05). (D) Representative western blot of Slug protein ( $n$  = 3). Quantitative qRT-PCR and densitometric analysis showing Slug and Snail are enhanced in DLK1 KO mice ( $n$  = 4, mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05).

However, other authors have proposed alternative modes of action for DLK1 invoking direct interaction with fibronectin<sup>32</sup> and other molecules, such as IGFBP1,<sup>6</sup> although these interactions do not involve the DLK1 EGF-like region. It has been established that three of the five canonical NOTCH ligands (Jagged 1, Dll1, and Dll4) are expressed in endothelial cells and play critical roles in vascular angiogenesis.<sup>12</sup> For example, maintenance of arterial identity relies on the Notch1–Dll interaction.<sup>33,34</sup> Heterozygous deletion of Dll4 in mice or pharmacological inhibition of NOTCH signalling was associated with increased numbers of filopodia-extending endothelial tip cells and increased expression of tip cell marker genes compared with controls,<sup>35</sup> thus suggesting that Dll4 is a negative regulator of vascular sprouting. Dll4 and Jagged1 have opposing effects on sprouting angiogenesis mediated by VEGF signalling, by controlling the equilibrium between tip and stalk cells through a mechanism regulated by the glycosyltransferase Fringe, which post-translationally modifies the NOTCH receptors.<sup>33</sup> In zebrafish, the absence of NOTCH promotes a shift towards the tip cell phenotype, favouring vessel sprouting, and

loss of Dll4 was associated with an increased endothelial cell number.<sup>36</sup> In addition, several studies have found that the NOTCH pathway is generally related to angiogenesis inhibition, at least when the canonical ligand Dll4 is involved (see Phng and Gerhardt<sup>37</sup> for review). The interaction between canonical and non-canonical NOTCH ligands is a complex one<sup>38</sup> and further studies are needed to establish the precise interplay of DLK1 with the canonical NOTCH ligands in the vasculature. The phenotype found in the retinas of *Dlk1*-null mice (increased number of vessels, tip cells, and filopodia in selective areas) is consistent with the antiangiogenic action of DLK1 observed in cultured cells and in the zebrafish model. Our data clearly show that Dlk1 interferes with Notch signalling but do not define the precise level of interaction or the Notch canonical ligand potentially affected. Thus, a straightforward interpretation of discrepancies between the vascular phenotype observed in this study in mice and zebrafish and those previously reported in models bearing genetic modifications of NOTCH canonical ligands is still premature.



Antagonism of the NOTCH pathway by the use of decoys has proven to be effective in animal models of tumour progression<sup>39</sup> and the use of endogenous inhibitors of the NOTCH pathway has been claimed to represent a potential therapeutic avenue.<sup>40</sup> The regulation of angiogenesis in tumours is the object of intense study in the context of providing effective means of deferring or suppressing human tumoral growth. However, tumours seem to find mechanisms of escape from anti-VEGF-directed therapies,<sup>41</sup> and hence, it is essential to search for new candidates and targets mediating an antiangiogenic effect. In this pathological setting, and supported by our observations in zebrafish tumour-induced angiogenesis, it will be worth determining the potential of DLK1 to abrogate tumour-dependent angiogenesis in mammals.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgments

We thank José Félix de Celis for critical review of the manuscript and all members of the Lamas lab for helpful discussion.

**Conflict of interest:** A provisional patent based on this work was filed in October 2010 (ES1641.793) by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

## Funding

This work was supported by the conjoint grant Cardiorep S2006/BIO-0194 from the Comunidad Autónoma de Madrid (to S.L., J.L.P., and J.M.R.), CSD 2007-00020 (to S.L. and M.M.), SAF2009-07520 (to S.L.), and BFU2007-61094 (to J.L.) all from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN).

## References

- Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V. dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem* 1993;**268**:3817–3820.
- Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993;**73**:725–734.
- Sul HS. Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Mol Endocrinol* 2009;**23**:1717–1725.
- Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Ramirez JJ, Bonvini E et al. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res* 2005;**303**:343–359.
- Bray SJ, Takada S, Harrison E, Shen SC, Ferguson-Smith AC. The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in *Drosophila*. *BMC Dev Biol* 2008;**8**:11.
- Nueda ML, Garcia-Ramirez JJ, Laborda J, Baladron V. dlk1 specifically interacts with insulin-like growth factor binding protein 1 to modulate adipogenesis of 3T3-L1 cells. *J Mol Biol* 2008;**379**:428–442.
- Sanchez-Solana B, Nueda ML, Ruvira MD, Ruiz-Hidalgo MJ, Monsalve EM, Rivero S et al. The EGF-like proteins DLK1 and DLK2 function as inhibitory non-canonical ligands of NOTCH1 receptor that modulate each other's activities. *Biochim Biophys Acta* 2011;**1813**:1153–1164.
- Nueda ML, Baladron V, Sanchez-Solana B, Ballesteros MA, Laborda J. The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells. *J Mol Biol* 2007;**367**:1281–1293.
- Andersen DC, Jensen L, Schroder HD, Jensen CH. 'The preadipocyte factor' DLK1 marks adult mouse adipose tissue residing vascular cells that lack *in vitro* adipogenic differentiation potential. *FEBS Lett* 2009;**583**:2947–2953.
- Yevtdiyenko A, Schmidt JV. Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Dev Dyn* 2006;**235**:1115–1123.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;**358**:2039–2049.
- Gridley T. Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol* 2010;**92**:277–309.
- Takeshita K, Satoh M, Li M, Silver M, Limbourg FP, Mukai Y et al. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 2007;**100**:70–78.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:6348–6352.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995;**377**:355–358.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* 2007;**2**:329–333.
- Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Takehana Y, Yoshimura N. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1997;**122**:1061–1066.
- Mikrova NA, Casciari JJ, Riordan NH. Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings *ex vivo* and subcutaneous Matrigel plugs *in vivo*. *J Angiogenesis Res* 2010;**2**:2; doi:10.1186/2040-2384-2-2.
- Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 2010;**5**:1518–1534.
- Lawson ND, Weinstein BM. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2002;**248**:307–318.
- Parsons MJ, Pisharath H, Yusuff S, Moore JC, Siekmann AF, Lawson N et al. Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech Dev* 2009;**126**:898–912.
- Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 2002;**22**:5585–5592.
- Raghuveer R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, Ettinger R, Rudikoff E, Riggins P et al. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells* 2008;**17**:495–507.
- Morohashi Y, Kan T, Tominari Y, Fuwa H, Okamura Y, Watanabe N et al. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *J Biol Chem* 2006;**281**:14670–14676.
- Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc* 2007;**2**:2918–2923.
- Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol* 2008;**182**:315–325.
- Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004;**18**:99–115.
- Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, Leslie RG, Jensen TG, Kassem M. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res* 2004;**19**:841–852.
- Cramer RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schroder HD, Olesen JL et al. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J Physiol* 2004;**558**:333–340.
- Sakajiri S, O'Kelly J, Yin D, Miller CW, Hofmann WK, Oshimi K et al. Dlk1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Leukemia* 2005;**19**:1404–1410.
- Chen L, Qanie D, Jafari A, Taipaleemaki H, Jensen CH, Sanz ML et al. Delta-like 1/fetal antigen-1 (Dlk1/FA1) is a novel regulator of chondrogenic cell differentiation via inhibition of the AKT-dependent pathway. *J Biol Chem* 2011;**286**:32140–32149.
- Wang Y, Zhao L, Smas C, Sul HS. Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2010;**30**:3480–3492.
- Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 2009;**137**:1124–1135.
- Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* 2004;**18**:2469–2473.
- Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, Duarte A et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:3225–3230.
- Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* 2007;**445**:781–784.
- Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 2009;**16**:196–208.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 2008;**27**:5148–5167.
- Funahashi Y, Hernandez SL, Das I, Ahn A, Huang J, Vorontchikhina M et al. A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *Cancer Res* 2008;**68**:4727–4735.
- Dikic I, Schmidt MH. Notch: implications of endogenous inhibitors for therapy. *Bioessays* 2010;**32**:481–487.
- Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:592–603.

## **Supplementary Data**

### **Detailed Methods**

#### Adenoviruses

Adenoviruses encoding GFP, DLK1-GFP (bicistronic) or DLK1-HA were obtained from Vector Biolabs. Adenoviruses were purified using the Adeno-X Maxi Purification Kit (Clontech) and titered using the Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech)

#### Cell lines, endothelial cells isolation and culture

Mouse 3T3-L1 cell line was routinely maintained in DMEM with 10% bovine calf serum and 1% penicillin-streptomycin (P/S). The 293A cell line, used to amplify the adenoviruses, was maintained in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS). Bovine aortic endothelial cells (BAEC) and porcine aortic endothelial cells (PAEC) were obtained from cow and pig aortas at a local slaughterhouse and cultured as described<sup>1</sup>. For isolation of mouse lung endothelial cells (MLEC), lungs from 129 SVJ wild-type and DLK1 null mice were excised, collagenase-digested, and further disaggregated to produce a single cell suspension. The mixed population obtained was first subjected to negative selection with anti FcγRII/III antibody (CD16/CD32) (BD<sup>TM</sup>) and then to positive selection with anti ICAM-2 antibody (CD102) (BD<sup>TM</sup>) and anti-IgG-coated magnetic beads (Invitrogen). MLECs were grown on a mixture of fibronectin (Sigma), type I collagen (Vitrogen 100) and 0.1% gelatine (Sigma) coated plates with DMEM + Ham's F-12, 20% FBS, 1% P/S, 2 mM Glutamine and brain cow extract growth factor for endothelial cells (ECGF). In the case of HUVEC, these were obtained from umbilical cords of normal deliveries (after approval by the ethics committee of the Hospital "Ruber Internacional") and in agreement with principles outlined in the declaration of Helsinki. Animals were handled in agreement with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals contained in Directive 2010/63/EU of the European Parliament. Approval was granted by the local ethics review board of Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".

For human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) isolation, umbilical cords were digested with 0.1% collagenase at 37°C for 20 minutes. Endothelial cells were collected and grown on 0.2% gelatin with Medium 199 + 20% FBS, 1% P/S and ECGF.

#### Western Blot Analysis

Cells were lysed in RIPA buffer with a Protease Inhibitor cocktail (Roche) and 1% SDS, then these lysates were sonicated and incubated at 4°C for 30 minutes. Total protein concentration was determined using BCA reagent (Pierce). Lysates were subjected to 10% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were blocked with TBS containing 5% BSA or milk for 1 h and probed with DLK1 antibody (1:2500; Santa Cruz), anti-NICD (1:1000; Abcam), anti-Hey (1:1000; Santa Cruz), anti-Slug (1:500; Santa Cruz) and anti- $\beta$  Actin (1:10000; Sigma). Following incubation at 4°C overnight, membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse (Odyssey, 926-32211 and 926-32220, respectively) at room temperature for 1h. Detection was performed using the LI-COR Odyssey Infrared Imaging System. The optical density of the protein bands was analyzed by Multi-Gauge V3.0.

#### Apoptosis

MLEC from wild-type and DLK1 null mice were treated with staurosporine at 2.5  $\mu$ M for 2, 4, 8 and 19 hours. Cells were resuspended in 100  $\mu$ l of annexin-binding buffer (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>) plus 2.5  $\mu$ l annexin V and 5  $\mu$ l 7-Amino-Actinomycin (7-AAD). After 15 min of incubation at room temperature, 200  $\mu$ l of annexin-binding buffer was added and apoptosis and necrosis were analysed by flow cytometry (FACSCanto II High Throughput Sampler Option; Becton Dickinson)

#### Cell transfection and luciferase assay

DLK1 plasmid was obtained from Origene (pCMV6 XL4, human cDNA clone, SC127962). A hemagglutinin tag was added in order to detect the exogenous protein (Vector Biolabs). The Hes-1 luciferase reporter construction, containing a 350 bp mouse promoter fragment of the Hes-1 gene inserted upstream of the luciferase gene in pGL2 Basic, has been reported elsewhere <sup>2</sup>. Endothelial cell cultures at 60-70% confluence were co-transfected with Hes-1 luciferase reporter plus Renilla vector (pGL2, Promega) with lipofectamine (Invitrogen). Twenty four hours after transfection, luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and expressed as fold induction relative to levels obtained with transfection of control plasmids.

#### Scratch assay

Endothelial cell monolayers were mechanically wounded and the rate of coverage of the denuded area was monitored by time-lapse microscopy for 24 hours using a Leica AF6000 LX microscopy coupled to a monochromatic Hamamatsu CCD C9100-02 camera.

#### Tube-like structure formation in vitro

The microcapillary-like formation assay was performed by using 96-well culture plates coated with 40  $\mu$ l of Matrigel (BD Bioscience) <sup>3</sup> diluted 1:1 in Medium 199 per well. After 30 min at 37°C, porcine endothelial cells ( $3 \times 10^4$ ) in 0.1 ml of 10% FBS-DMEM or mouse lung endothelial cells ( $3 \times 10^4$ ) in D-MEM:F-12 (1:1) + 8% FBS + 2 mM Gln with or without VEGF (5 ng/ml) (R&D System) were seeded on the polymerized Matrigel and incubated at 37°C for 5-6 hours. Angiotubes were stained with MTT (Sigma) for 30 minutes. Images of the capillary-like structures were taken at 2x magnification with a Nikon eclipse TE2000-U inverted-microscope coupled to a digital-sight DS-2Mv. Tube formation was quantified by using the Angioquant software and double-checked by eye-counted.

#### Aortic ring assay

Angiogenesis was studied by culturing rings of mouse aorta in three-dimensional gels as described<sup>4</sup>. Thoracic aortas were removed from mice sacrificed by cervical dislocation and immediately transferred to a culture dish containing ice-cold phosphate buffered saline. The periaortic fibro-adipose tissue was carefully removed without damaging the aortic wall. Pieces of aortas were immediately exposed or not to recombinant adenoviruses at  $1 \times 10^9$  or  $5 \times 10^9$  plaque-forming units/ml. Four hours after infection, one-millimeter long rings were embedded in Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences) in 96-well plates. Each well contained 100  $\mu$ l of MCDB131 supplemented with 2.5% mouse serum, 1% glutamine and 1% P/S. After 6 days of culture, explants were examined by microscopy. The vessel length per ring was quantified by ImageJ software.

#### Matrigel plug assay in vivo

Growth Factor Reduced Matrigel Matrix Phenol Red-free (500  $\mu$ l) (BD, Bioscience), heparin (0.3 mg/ml) (Sigma), and VEGF (250 ng/ml), adenovirus, DAPT (10 mg/kg of body weight) or DMSO (0.01%), as appropriate (see fig. 2) were injected subcutaneously in the abdominal region of wild-type mice. Mice were anesthetized by injecting (i.p) ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg) and constantly monitored by veterinarian surveillance of reflex absence. Animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber after day 10 of implantation, plugs were removed for histological and immunohistochemical examination. Formaldehyde-fixed plugs were embedded in paraffin-wax and sectioned followed by staining with hematoxylin and eosin and examination under a light microscope (Olympus DX50, Olympus America Inc., Center Valley, PA)

#### Retinal isolation and staining

P0-P14 pups were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and eyes enucleated and fixed overnight in 1% PFA at 4°C. Then, retinas were dissected out and whole-mount stained with

biotinylated *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (Sigma-Aldrich) followed by streptavidin, Alexa Fluor 647 conjugate (Invitrogen) as described <sup>5</sup>. Images from 8-10 retinas per experimental group were acquired in a Nikon A1R confocal microscope, and quantification of tip cells, filopodia and vascular area was carried out with ImageJ software.

#### Zebrafish DLK1 gain- and loss-of-function assays

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained and raised under standard conditions at 28°C. Transgenic *Tg(fli1:EGFP)* and *Tg(gata1:dsRed)* embryos were used to track endothelial cell populations and blood flow. *Tg(fli1:EGFP); (gata1:dsRed)* were generated by standard crossing of individual lines. A plasmid encoding the human DLK1 cDNA was injected at different concentrations in one cell stage embryos. The same plasmid without the human DLK1 cDNA was used as a control. Embryos were allowed to develop and pictures were taken at 72 hpf using a dissection microscope equipped with epifluorescence (MZF16FA, Leica) and a digital camera (DFC310FX, Leica). Anti-sense morpholinos (MO) (Gene-Tools, OR, USA) (5'-CCAAAACCTCACAGAAGCTCGTCAT-3') were designed to target the initiation codon (ATG) of the zebrafish *Dlk1* gene (NCBI Reference Sequence: XM\_001921677.1). A random sequence MO was used as a control. Each was injected at 62.5, 125 and 250 µM in one or two cell stage embryos that were allowed to develop until 6 dpf when pictures were taken. For the rescue experiment DLK1 morpholino at 250 µM and 500 pg of plasmid encoding the human DLK1 were co-injected in one cell embryos and pictures were taken at 6 dpf. At least 100 embryos per condition were analyzed per experiment.

#### Zebrafish tumor xenograft angiogenesis assay.

*Tg(fli:eGFP)* <sup>6</sup> embryos were injected at 1 cell stage with MO against zfDLK1 or capped hDLK1 mRNA or both, and allowed to develop at 28 °C. Twenty-four hours postfertilization fish embryos were incubated with water containing 0.2 mM 1-phenyl-2-thio-urea (Sigma) to prevent pigmentation. At 48 h post-fertilization, zebrafish embryos were dechorionated with help of a sharp tip forceps and anesthetized with

tricaine (MS-222, Sigma). Anesthetized embryos were transferred onto a modified agarose gel for microinjection. Before injection, tumor cells were labeled in vitro with 2 µg/mL of 1,1-Dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI, Fluka, Germany) and were further incubated for 24 h. Cells were resuspended in DMEM (Sigma) and 2-5 nL of tumor cell solution (25 cells/nL) were injected into the perivitelline cavity of each embryo using an Eppendorf microinjector (FemtoJet 5247, Eppendorf). After injection, the fish embryos were immediately transferred into housing-keeping water. Injected embryos were kept at 28 °C and were examined 2 days after to monitor tumor-induced angiogenesis from sub-intestinal vessels (SIV) using a fluorescent microscope (MZFL6FA, Leica) equipped with a digital camera (MZFL6FA, Leica). Each experiment, which included 25-50 embryos, was repeated at least twice.

#### Zebrafish NOTCH-reporter assay

Tg(ptfla:eGFP)<sup>ih1</sup> is a transgenic NOTCH-responsive zebrafish line harboring 12 Rbp-Jκ binding sites up-stream of the β-globin minimal promoter and the enhanced Green fluorescent protein reporter gene <sup>7</sup>. Tg(ptfla:eGFP)<sup>ih1</sup> embryos were injected at 1 cell stage with MO against zfDLK1 or capped hDLK1 mRNA or were treated at 36 hpf with DAPT for 12 hours and allowed to develop at 28°C. Twenty-four hours postfertilization fish embryos were incubated with water containing 0.2 mM 1-phenyl-2-thio-urea (Sigma) to prevent pigmentation. At 48 hpf pictures containing around 15 embryos (petri-dish with at least 50 embryos) were taken (MZFL6FA, Leica and MZFL6FA, Leica) and luminosity in the RBG channel of at least 5 pictures per experiment was measured with Adobe PhotoShop CS3 Extended (Adobe Systems Incorporated).

#### RNA extraction and real-time PCR

Cell monolayers were washed with phosphate-buffered saline, total RNA was prepared with phenol-chloroform extraction. cDNA synthesis was undertaken using iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, cat# 170-8891). Quantitative real-time PCR was performed using C1000 Thermal Cycler CFX96 Biorad. The endogenous Dlk1 cDNA was amplified by Sso Fast Eva Green Supermix (Biorad, cat# 172-5201) using the appropriate primers (Table I).

## Statistical analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for at least n=3 experiments. Comparisons were evaluated by Student's t-test for unpaired data or one-way analysis of variance when parametric tests were possible or by non-parametric tests, as appropriate. *p* values <0.05 were considered as statistically significant.

## Supplementary References

1. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6348-6352.
2. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995;377:355-358.
3. Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Takehana Y, Yoshimura N. Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Br J Pharmacol* 1997;122:1061-1066.
4. Mikirova NA, Casciari JJ, Riordan NH. Ascorbate inhibition of angiogenesis in aortic rings ex vivo and subcutaneous Matrigel plugs in vivo. *J Angiogenes Res* 2010;2:2.
5. Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat Protoc* 2010;5:1518-1534.
6. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2002;248:307-318.
7. Parsons MJ, Pisharath H, Yusuff S, Moore JC, Siekmann AF, Lawson N *et al.* Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech Dev* 2009;126:898-912.



**Supplementary Table 1**

| <b>Primer</b>                 | <b>Sequence</b>              |
|-------------------------------|------------------------------|
| Dlk For Bovine                | 5'AGTGCCCATGGAGCTGAATG3'     |
| Dlk For Mouse, Human, Porcine | 5'AGCACCTATGGGGCTGAATG3'     |
| Dlk Rev Bovine                | 5'CCGGATGTCTAGGTCACAGAG3'    |
| Dlk Rev Mouse                 | 5'CCGAACGTCTATTTTCGCAGAA3'   |
| Dlk Rev Human, Porcine        | 5'CCGAACATCTCTATCACAGAG3'    |
| GAPDH For                     | 5'GCCTGGTCACCAGGGCTGC3'      |
| GAPDH Rev                     | 5'CTCGCTCCTGGAAGATGGTGATGG3' |
| m Hey For                     | 5'CACGCCACTATGCTCAATGT3'     |
| m Hey Rev                     | 5'TCTCCCTTCACCTCACTGCT3'     |
| m Snail For                   | 5'TCTGAAGATGCACATCCGAAGCCA3' |
| m Snail Rev                   | 5'AGGAGAATGGCTTCTCACCAGTGT3' |
| Slug For                      | 5'AGATGCACATTCGAACCCAC3'     |
| Slug Rev                      | 5'GTCTGCAGATGAGCCCTCAG3'     |

## Supplementary Figure Legends

### Figure S1. DLK1 regulates motility and proliferation of vascular endothelial cells.

**A.** Representative images from porcine aortic endothelial cells under basal conditions, expressing a control vector, pCMV6, overexpressing DLK1 or treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor, DAPT, at time zero and at the time of the control closure. Red lines mark the migratory edge of the “wound”. **B.** Representative pictures of lung endothelial cells from wild-type and DLK1-null mice. **C.** Quantitative analyses represent percentage of the wound area at closure time, respectively (mean  $\pm$  SEM of n=3 independent preparations assayed per triplicate; \*p<0.05). **D.** Quantitative analysis showing a higher viability in lung endothelial cells from null mice compared to wild-type. Error bars represent SEM from at least three independent preparations (\*p<0.05). **E.** Quantification of BrdU-positive cells showing increased cell proliferation in DLK1 null mice. Representative images from BrdU (green) and DAPI (blue)-stained cells from wild-type and null mice at 24 hours. Scale bars: 50  $\mu$ m

**Figure S2. DLK1 absence does not modify endothelial cell apoptosis.** MLEC from WT and KO mice were treated with 2.5  $\mu$ M staurosporine for 2, 4, 8 and 19 hours. After incubation with Annexin V and 7-Amino-Actinomycin (7-ADD), apoptotic and necrotic cells (%) were analyzed by flow cytometry. Bars represent mean  $\pm$  SEM (n=2 independent experiments, each performed in triplicate).

### Figure S3. Retinal hypervascularization in the DLK1 null developing vasculature.

Whole-mount immunofluorescence for isolectin B4 in the p5 and p14 KO pups showing areas of a dense, hyperfused plexus in the retinal endothelium. Quantification of retina coverage by vessels at the affected areas vs non-affected in the same retina from null mice. Values represent mean  $\pm$  SEM from 10 mice per group (\*p<0.05). Scale bars: 200  $\mu$ m

### Figure S4. hDLK1 gain-of-function phenotype in zebrafish is dose-dependent. A-C:

Tg(Fli:eGFP); Tg(gata1:dsRed) embryos at 72 h post fertilization. **A.** Bright-field image

comparing general morphology in a WT embryo (upper) and hDLK1 500pg injected embryo (lower). **B.** Bright-field image showing detail of hDLK1 500 pg injected embryo. **C.** Fluorescent microscope image showing intersegmental artery sprouts and GATA-dsRED-labeled erythrocytes. Note the aberrant sprouting of the intersegmental vessel (ISV) and the lack of normal blood flow. This phenotype is more dramatic than the one shown in Figure 4D-F. **D.** Quantification of ISV defects in 72 hpf embryos injected with hDLK1 plasmid at different concentrations. Each experiment, which included 100-300 embryos, was repeated at least twice. Bars represent mean  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$  vs control). Where error bars are not visible, they are smaller than data point. Scale bars: A: 2 mm; B,C: 200  $\mu$ m.

**Figure S5. DLK1 antagonizes the NOTCH pathway upstream of NICD signaling.** Microvessel-like structures formed by PAEC transfected with a control vector pCMV6 (basal) or a DLK1 expression plasmid, in the absence or presence of VEGF. The lower panel depicts that PAEC stably expressing NICD transfected with a DLK1 plasmid produce a similar endothelial network than cells under basal conditions. Graphs represent quantification of the number of tube-like structures from three independent preparations per group assayed per duplicate. Bars represent mean  $\pm$  SEM; \*, #  $p < 0.05$ . Scale bars: 1 mm

**Figure S6. DLK1 affects NOTCH signaling pathway in zebrafish.** NOTCH-responsive transgenic zebrafish (Tg(ptf1a:eGFP)<sup>jh1</sup>) at 2 dpf. **A:** control **B:** Treated with DAPT 50  $\mu$ M for 12 hours **C:** injected with MO DLK1 **D:** injected with capped hDLK1 mRNA. **E.** Quantification of picture's luminosity on the RBG channel for the different conditions assayed. Bars represent mean  $\pm$  SEM from 3 different preparations. (\*'  $p < 0.01$  vs control; \*  $p < 0.01$  vs control; #  $p < 0.05$  vs MO 250  $\mu$ M)

**Legend for video files**

Supplementary Videos (SV) 1 and 2: MLEC from *Dlk1* WT (SV1) or null (SV2) mice were subjected to scratch assay and wound was monitored along time until re-endothelization was complete.

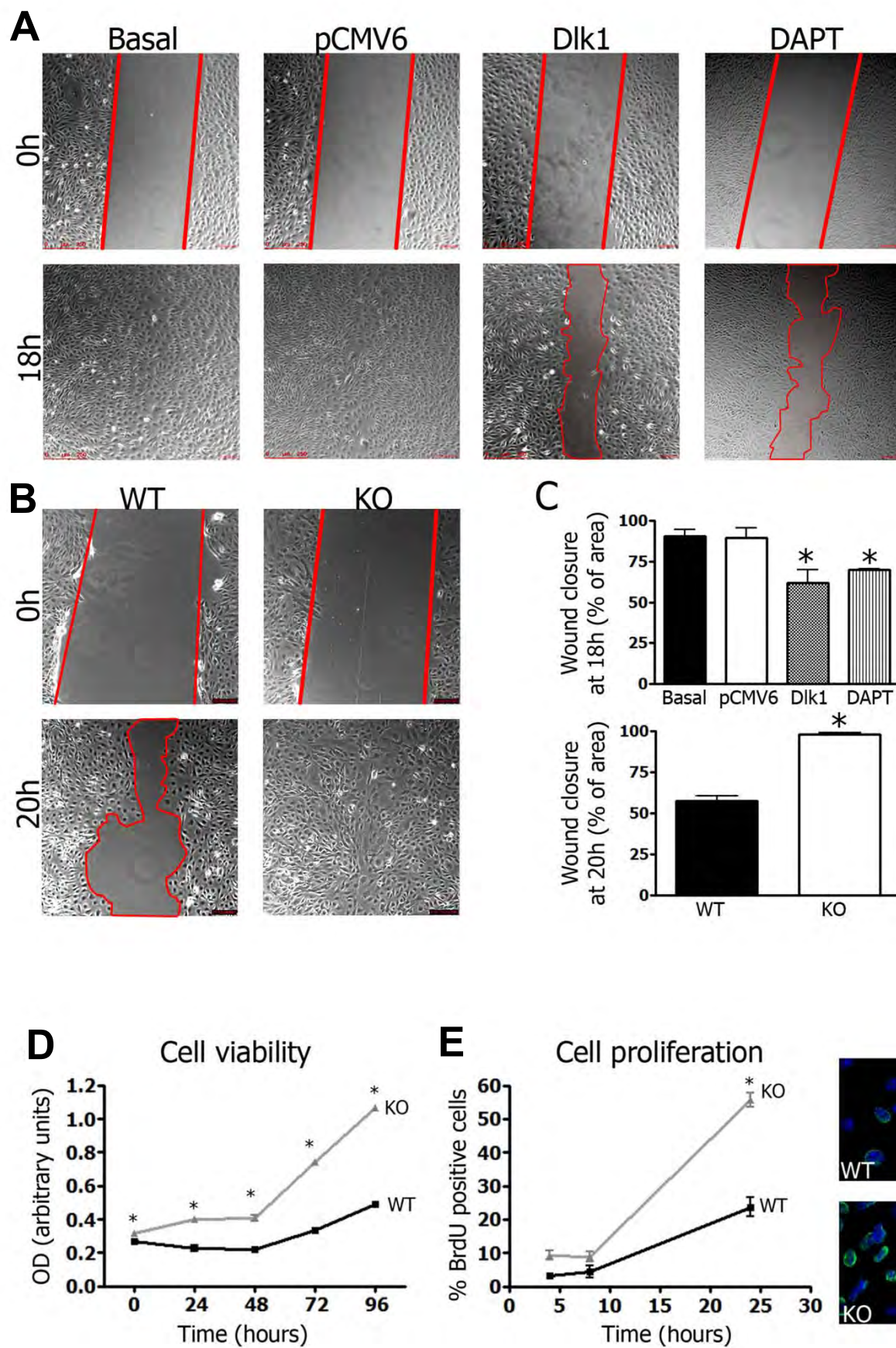
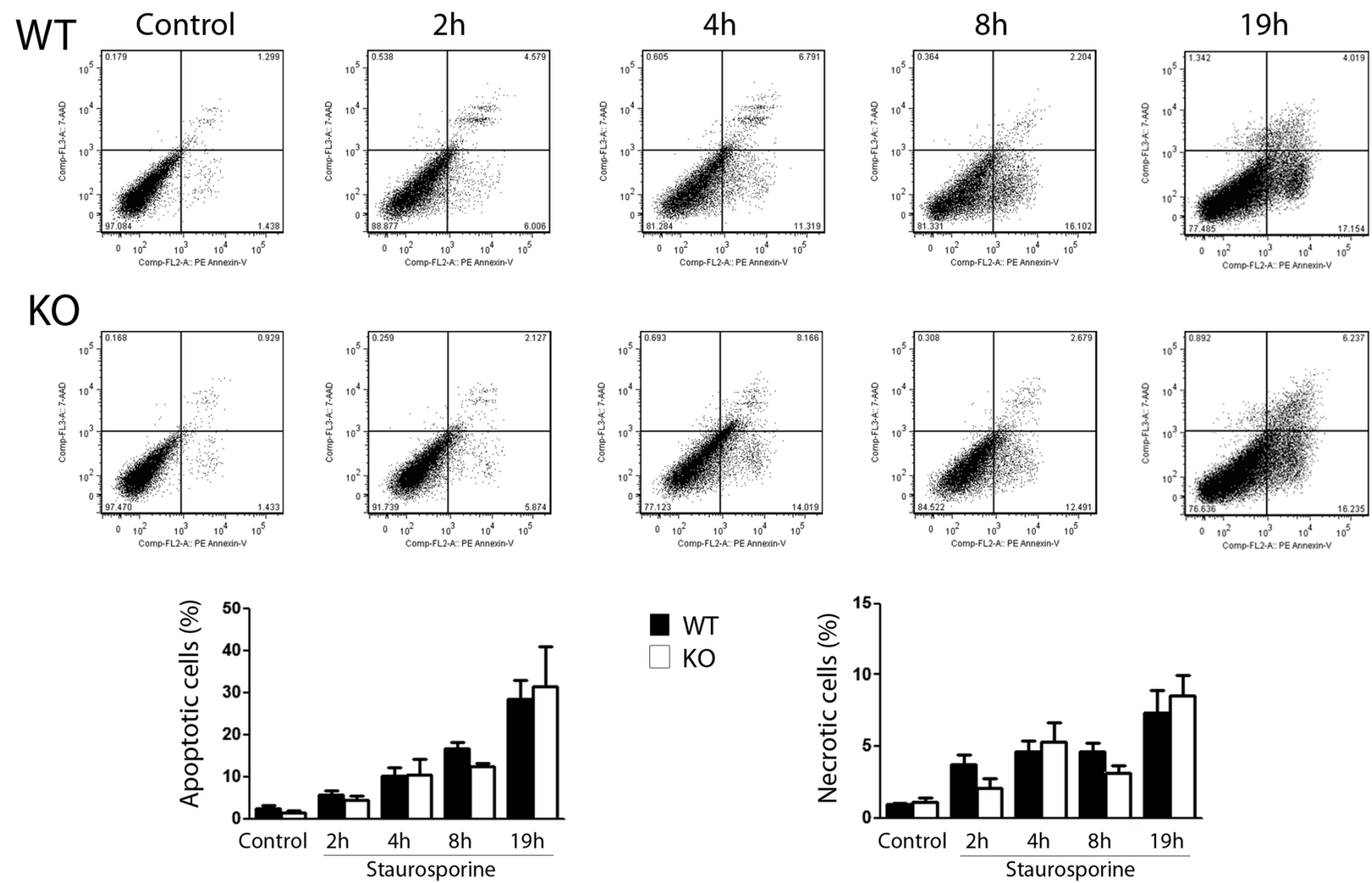


Figure S1



**Figure S2.**



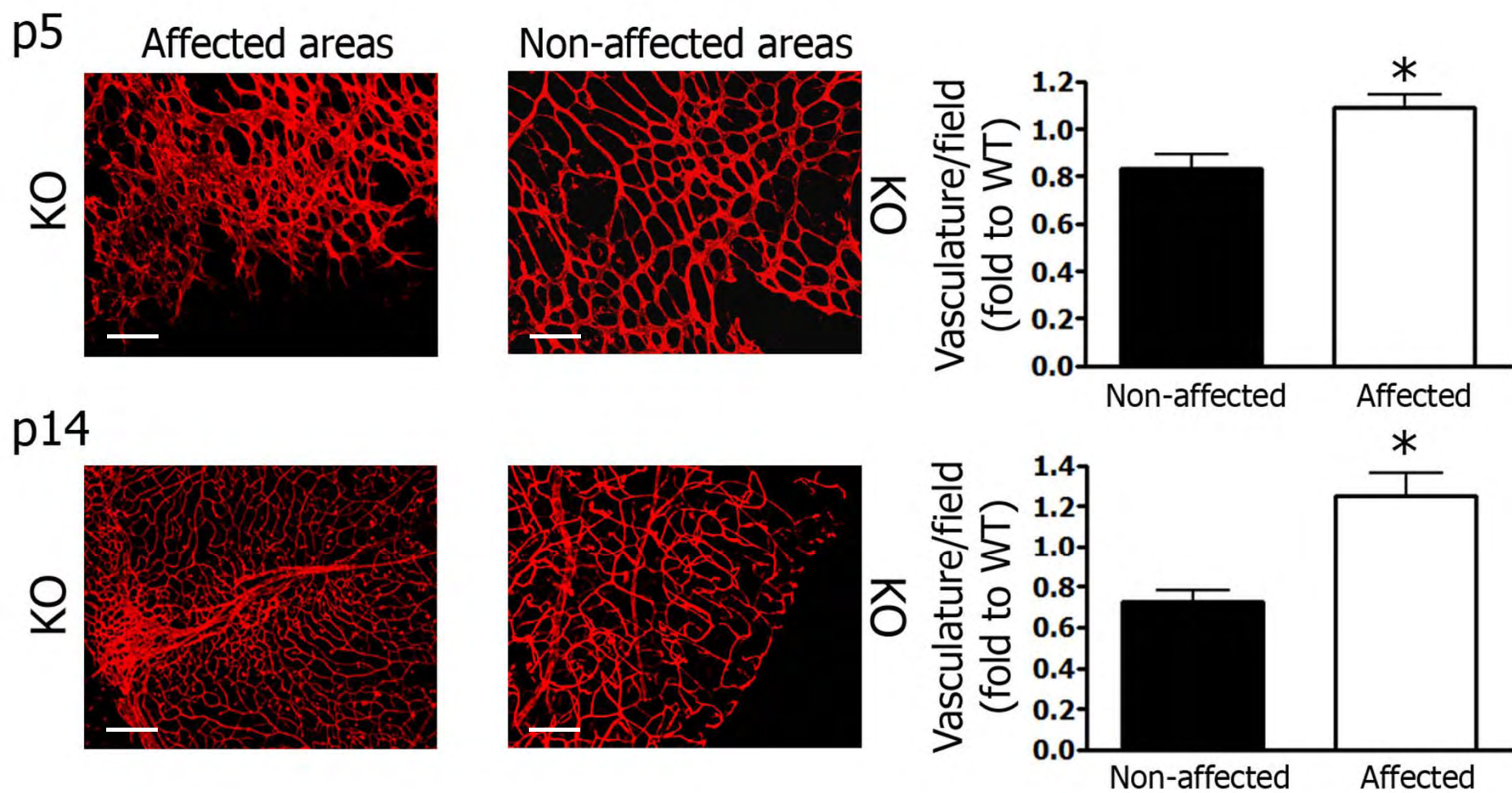


Figure S3

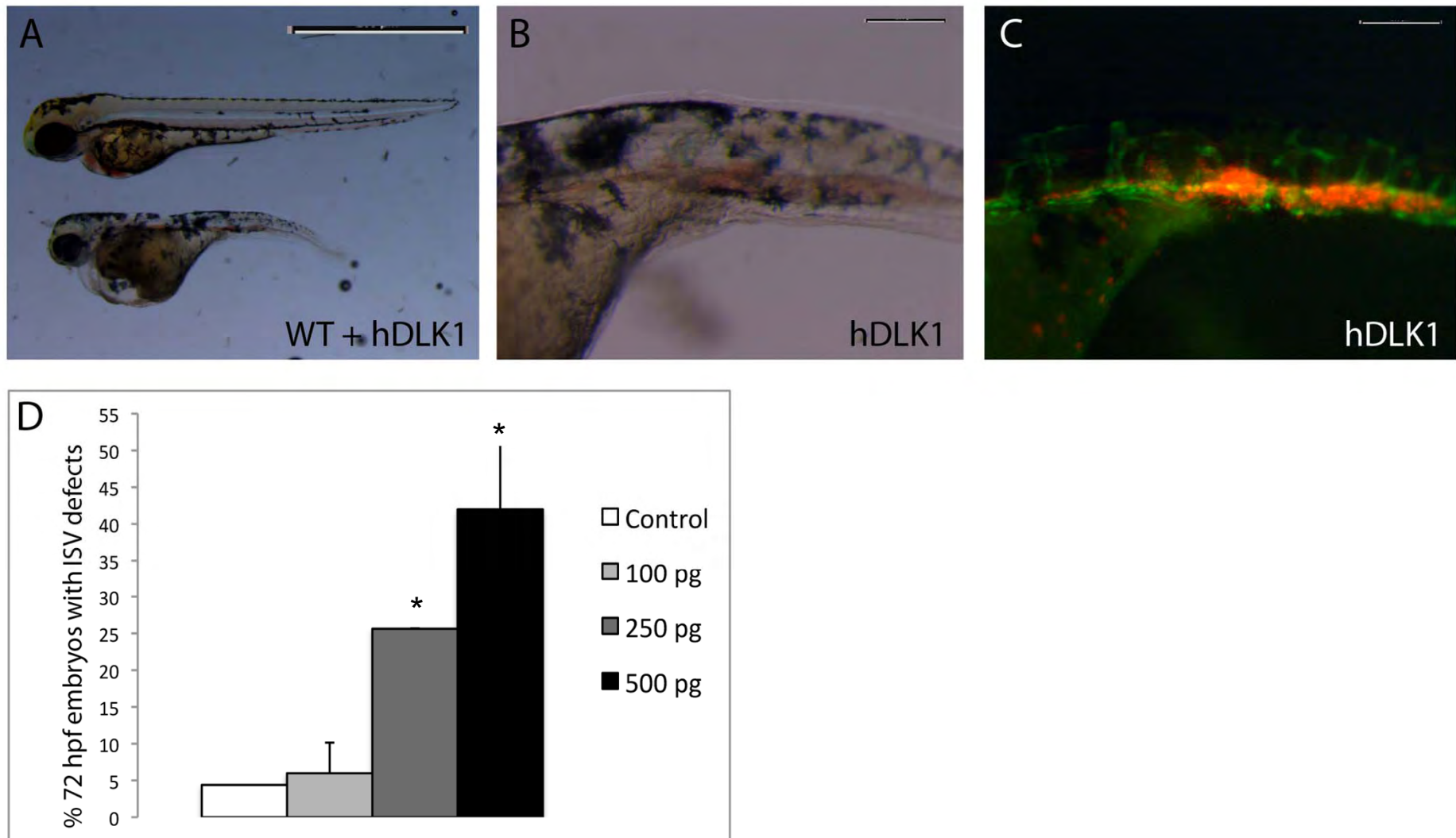
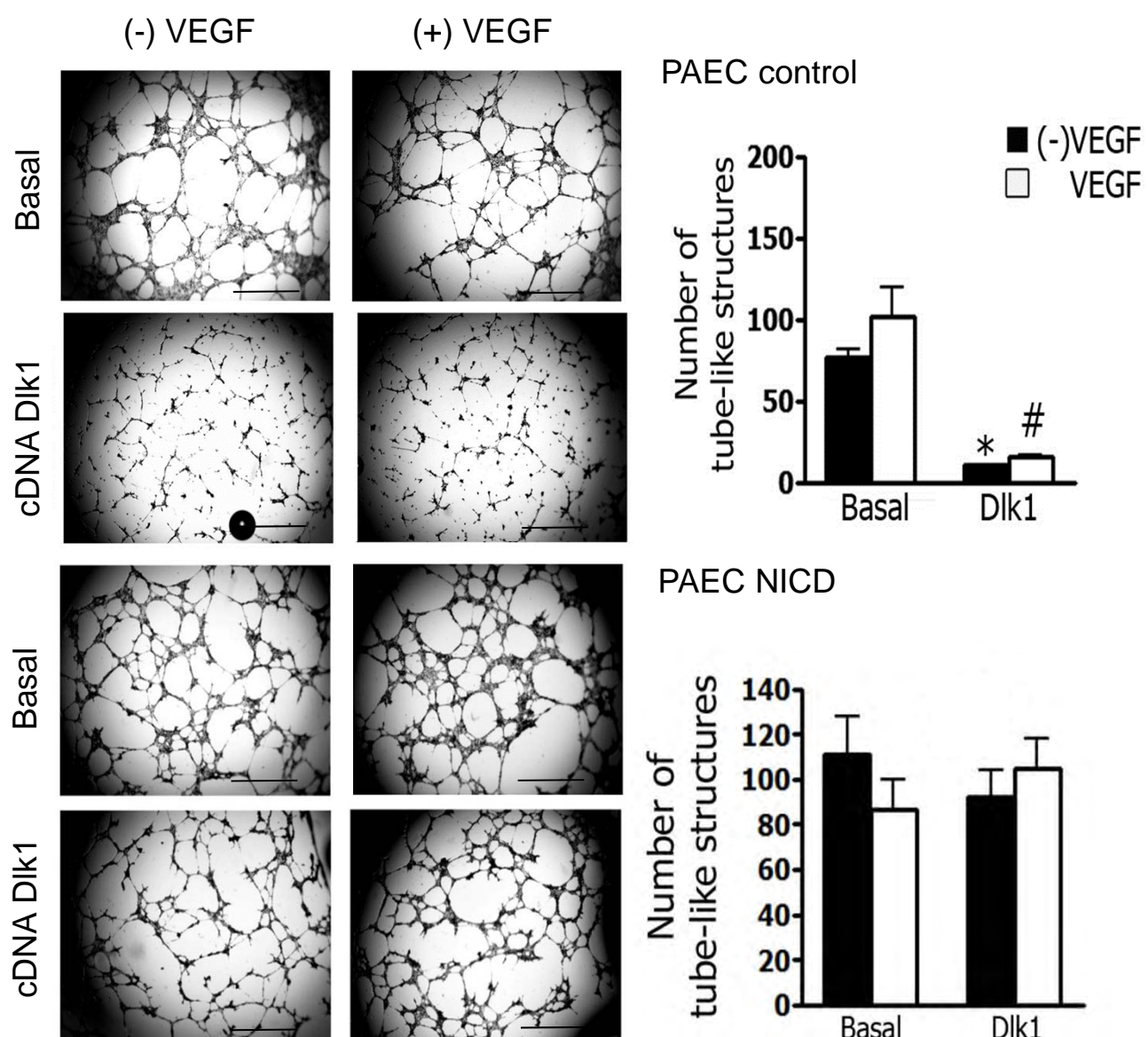


Figure S4





**Figure S5.**

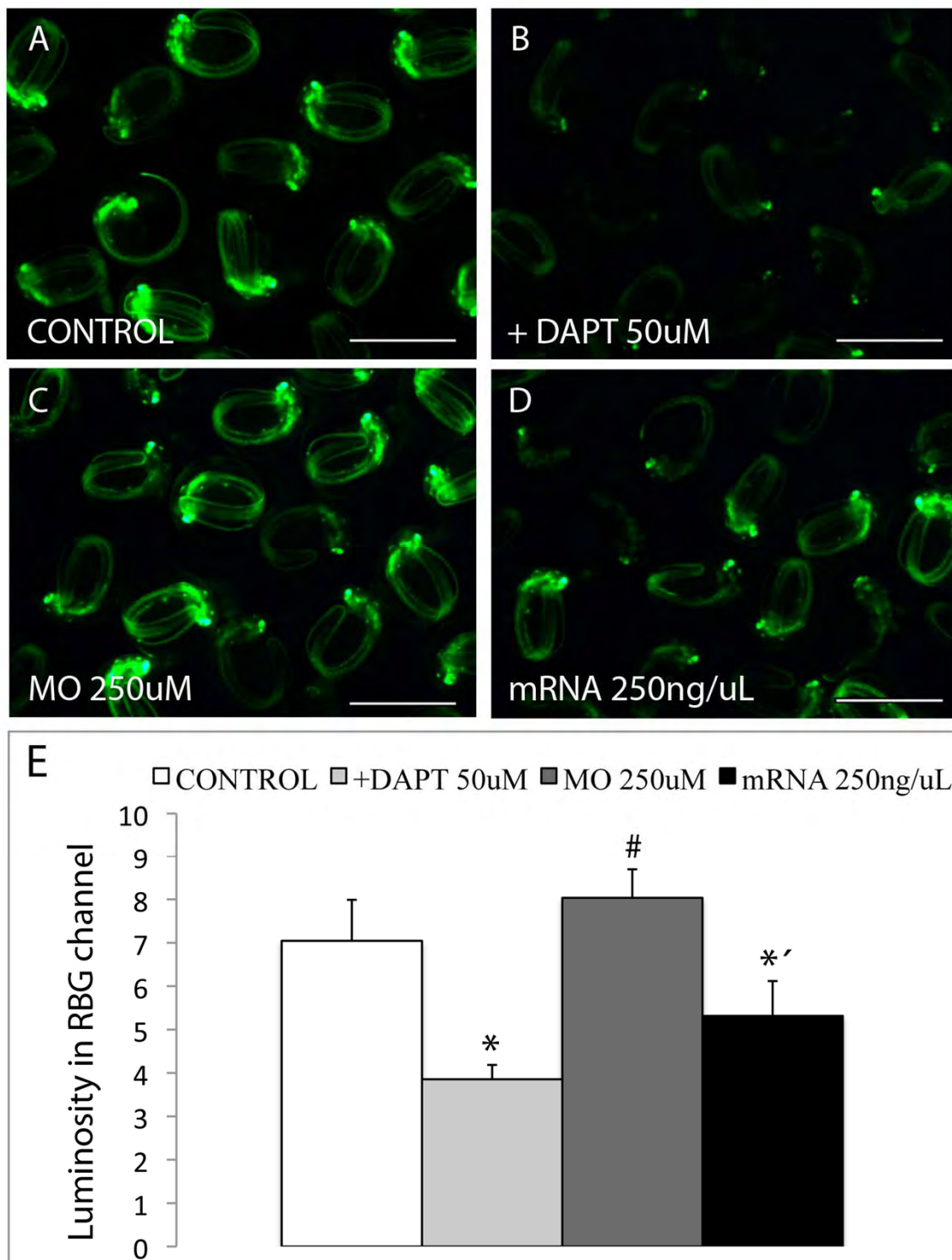


Figure S6.





## PATENTE

Inventores (p. o. de firma): Santiago Lamas, Patricia Rodríguez, M<sup>a</sup> Angeles Higuera, Jorge Laborda

Título: Uso de Dlk1 como inhibidor de angiogénesis

N.º de solicitud: P201031547                      País de prioridad: ES

Fecha de prioridad: 21 octubre 2010

## OTRAS PUBLICACIONES

Martinez-Ruiz, A., et al., *S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(24): p. 8525-30.

